Untersuchungen

über

das Erfrieren von Schimmelpilzen.

INAUGURAL-DISSERTATION

ZUR

ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE

DER

HOHEN PHILOSOPHISCHEN FAKULTAT

DER

UNIVERSITAT LEIPZIG

VORGELEGT VON

HUGO BARTETZKO

AUS KÖNIGSHÜTTE.

Leipzig

Gebrüder Borntraeger

1909

Untersuchungen

über

das Erfrieren von Schimmelpilzen.

INAUGURAL-DISSERTATION

ZUR

ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE

DER

HOHEN PHILOSOPHISCHEN FAKULTÄT

DER

UNIVERSITÄT LEIPZIG

VORGELEGT VON

HUGO BARTETZKO

AUS KÖNIGSHÜTTE.

ACAD. LUGD BAT. BIBL.

Leipzig

Gebrüder Borntraeger

1909

Angenommen von der mathematisch-naturwissenschaftlichen Sektion auf Grund der Gutachten der Herren Pfeffer und Chun.

Leipzig, den 19. Juni 1909.

Der Prorancellar.
Köster.

Sonderabdruck aus den Jahrbüchern für wissenschaftliche Botanik, 1909, Bd. XLVII, Heft 1.

Meinen lieben Eltern

Inhalt.

Seite

A. Einleitung 1
B. Methodisches 4
C. Spezieller Teil 8
I. Das Erfrieren der Objekte bei Vermeidung der Eisbildung . . . 8
II. Das Erfrieren der Objekte bei Eisbildung in der Nährlösung . . . 12
1. Die Bedeutung der Eisbildung für die Kälteresistenz und der Einfluß der erhöhten osmotischen Leistung auf die Lage des Erfrierpunktes 12
2. Die Bedeutung der Entwicklungsphase für die Lage des Erfrierpunktes 29
3. Der Ersatz der relativ rasch wirkenden Erfriertemperatur durch längere Einwirkung von Temperaturen über dem Erfrierpunkt . 32
III. Theoretische Betrachtungen 36
D. Zusammenfassung 41

A. Einleitung.

Es ist eine bekannte Tatsache, daß die Pflanzen eine spezifisch verschiedene Widerstandsfähigkeit gegen die Kälte besitzen. Ein Blick in die Natur vermag uns leicht hiervon zu überzeugen. Da gibt es Arten, die bereits der Wirkung des ersten Herbstfrostes unterliegen, während andere wiederum die strengste Winterkälte ohne Schaden vertragen. In ihren Folgeerscheinungen zeigt sich diese verschiedene Widerstandsfähigkeit in der geographischen Verbreitung der Arten. So vermögen die meisten tropischen Gewächse die klimatische Grenze ihrer Lebensfähigkeit nicht bis in unsere Breiten auszudehnen. Der Grund hierfür liegt nicht etwa in einer in unseren Gegenden unzureichenden Sommerwärme, denn die gärtnerische Kultur zeigt, daß derartige Gewächse während der wärmeren Jahreszeit auch bei uns ihr Fortkommen finden, sondern die Winterkälte ist es, die der Existenz dieser Pflanzen im Freien ein Ziel setzt. Ist doch auch die Anbaufähigkeit von Kulturpflanzen abhängig von dem Grade ihrer „Winterhärte", d. h. ihrer Fähigkeit, niedere Kältegrade zu ertragen. Im Gegensatz zu der Kälteempfindlichkeit tropischer Gewächse steht das Verhalten arktischer Pflanzen, die noch in Gegenden vegetieren, in denen die Wintertemperatur nicht selten zwischen — 30 bis — 50 ° C. schwankt[1]).

Diese wenigen Bemerkungen vermögen bereits kurz zu illustrieren, wie verschieden sich die einzelnen Pflanzenarten gegen die Kälte verhalten. Jeder Pflanze kommt also ein spezifisches Temperaturminimum zu, unterhalb dessen ihre Existenz schlechterdings nicht möglich ist. Wird dieses Minimum erreicht, so tritt in mehr

1) Drude, Handbuch d. Pflanzengeographie, 1890, S. 24; Schimper, Pflanzengeographie, 1898, S. 45.

oder weniger kurzer Zeit der Tod ein. Dieses Absterben pflegen wir als „Erfrieren“ zu bezeichnen.

Letzteres kann natürlich bei Organismen, die ein relativ hohes Minimum aufweisen, bereits bei Temperaturen über 0° erfolgen. Beispielsweise pflegen thermophile Pilze in ihren vegetativen Formen bei gewöhnlicher Zimmertemperatur abzusterben[1]). Aber auch bei höheren Pflanzen vermögen schon Temperaturen über 0° den Tod herbeizuführen. Nach Molisch[2]) gingen Blätter von *Episcia bicolor* und *Sciadocalyx Warscewitzii* in einer zwischen + 1,4 und + 3,7° C. schwankenden Temperatur innerhalb 5 Tagen zugrunde, während unter denselben Bedingungen die Blätter von *Tradescantia discolor* und *Tournefortia hirsutissima* nach 27 Tagen sich als abgestorben erwiesen. In allen diesen Fällen erfolgt der Tod ohne die Mitwirkung eines Faktors, der beim Erfrieren von Pflanzen erst dann eine Rolle spielen kann, wenn eine Einwirkung von Temperaturen unter 0° stattfindet. Dieser Faktor, durch den der Erfrierprozeß eine Komplikation erfährt, ist die in oder außerhalb der Pflanzenzellen infolge des Gefrierens der Pflanzensäfte erfolgende Eisbildung.

Letztere vermag in vielen Fällen den Tod der Pflanze zu veranlassen, was daraus hervorgeht, daß mitunter die gleiche Temperaturerniedrigung vertragen wird, wenn die Eisbildung infolge Unterkühlung unterbleibt. „So wird die geschälte Kartoffel, in der sich bei — 1° C. Eis bildet, schon bei dieser Temperatur getötet, während die ungeschälte Kartoffel, in der erst nach einer Abkühlung auf — 3 bis — 4° C. Eis entsteht, während einiger Tage ohne Schaden bei — 2° C. gehalten werden kann, und wenn z. B. in einem frostempfindlichen Blatte die Eisbildung nur an einzelnen Stellen stattfindet, so werden auch nur diese getötet“[3]).

Diese Beispiele mögen genügen, um uns zu zeigen, wie in gewissen Fällen die Eisbildung den Tod der Pflanze zur Folge hat. Anderseits aber kennen wir sogenannte „eisbeständige“ Pflanzen, die, wie der Name sagt, eine Eisbildung in ihrem Innern vertragen. So erwiesen sich z. B. nach den Untersuchungen von Göppert[4]) gewisse Objekte, wie *Lamium purpureum, Stellaria media, Helle-*

1) Nach unveröffentlichten Untersuchungen, die im hiesigen Institut ausgeführt wurden.

2) Molisch, Erfrieren der Pflanzen, 1897, S. 61.

3) Pfeffer, Pflanzenphysiologie, 1904, Bd. II, S. 298.

4) Göppert, Wärmeentwicklung in den Pflanzen, 1830, S. 62.

borus niger u. a., die bei — 11 bis — 12° C. steif gefroren waren, nach dem Auftauen als völlig lebend. Erst durch längeres Verweilen in gefrorenem Zustande oder aber durch eine allzu tiefe Temperaturerniedrigung gehen derartige eisbeständige Pflanzen zugrunde.

Wir zeigten also, daß das Erfrieren von Pflanzen einerseits ohne Eisbildung erfolgen kann, während in anderen Fällen dem Absterben eine Eisbildung vorangeht, die entweder direkt den Tod zur Folge hat oder aber vertragen werden kann. Zu diesen Erfahrungen einige weitere Beiträge zu liefern, war nun der Zweck der vorliegenden Arbeit, indem ich zu ermitteln suchte, ob die Eisbildung für die Kälteresistenz gewisser in dieser Hinsicht noch nicht näher untersuchter Objekte von Bedeutung sei. Zugleich sollte durch diese Untersuchungen auch die Lösung einer anderen Frage in Angriff genommen werden. Wie bekannt, erniedrigt sich der Gefrierpunkt einer Salzlösung mit zunehmender Konzentration. Dasselbe gilt von dem Zellsaft einer Pflanze bei einer Steigerung der osmotischen Leistung. So entstand denn die Frage, ob mit einer derartigen Herabsetzung der Gefriertemperatur des Zellsaftes eine Erhöhung der Resistenz der Pflanze gegen das Erfrieren verknüpft sei [1]).

Für die geplanten Untersuchungen schien es besonders aussichtsvoll, einige Schimmelpilze als Versuchsobjekte zu verwenden. Denn bezüglich der Eisbildung hat man es, wie später gezeigt werden wird, bei diesen Objekten bis zu einer gewissen Temperatur völlig in der Hand, ein Gefrieren der Versuchspflanzen zu bewirken oder zu vermeiden, und was die Steigerung der osmotischen Leistung anbetrifft, so gibt es wohl kaum Organismen, die einer so weitgehenden Erhöhung ihres Turgors fähig sind wie die Schimmelpilze [2]). Denn letztere pflegen bekanntlich auf eine Steigerung der Konzentration der Nährflüssigkeit mit einer Erhöhung der osmotischen Leistung zu antworten. Da sie nun imstande sind, noch auf Lösungen von beträchtlich hoher Konzentration zu wachsen, so können auf diese Weise recht ansehnliche Turgorwerte erreicht

1) Die Arbeit von N. Maximow, Zur Frage über das Erfrieren der Pflanzen (Journ. bot. éd. Sect. de Bot. de la Soc. imp. d. Nat. de St. Petersbourg 1908, p. 32 bis 46), der dieselben Fragen berücksichtigt, gelangte erst nach Abgabe meines Manuskriptes durch ein Referat (Bot. Ctbl. 1909, Bd. 110, p. 597) zu meiner Kenntnis.

2) Eschenhagen, Über den Einfluß von Lösungen verschiedener Konzentration auf das Wachstum von Schimmelpilzen. Diss., Leipzig 1889.

werden, womit natürlich eine entsprechende Gefrierpunktserniedrigung des Zellsaftes verbunden sein muß.

Schließlich sei bemerkt, daß bei Gelegenheit der Behandlung der vorerwähnten Fragen noch andere Faktoren berücksichtigt werden konnten, die für die Kälteresistenz von Schimmelpilzen von interessanter Bedeutung sind und an geeigneter Stelle näher präzisiert werden sollen.

B. Methodisches.

Unser erstes Ziel, die Beschaffung eines geeigneten Versuchsmaterials, bot keine besonderen Schwierigkeiten. Wie aus einer Reihe früherer Arbeiten[1]) hervorgeht, ist der bekannte *Aspergillus niger* für viele physiologische Untersuchungen ein geeignetes Versuchsobjekt, da er auf den verschiedensten Nährsubstraten ein gutes Wachstum zeigt. Er wurde daher für unsere Zwecke in erster Linie benutzt. Doch erwiesen sich auch einige andere Schimmelpilze, nämlich *Penicillium glaucum*, *Botrytis cinerea* und *Phycomyces nitens*, als günstige Versuchsobjekte. Es ist selbstverständlich, daß in allen Fällen nur Reinkulturen zur Verwendung gelangten.

Um eine möglichste Gleichmäßigkeit des Materials zu erzielen, wurden sämtliche Objekte zumeist nur in der ersten Phase ihrer Entwicklung benutzt, nämlich dann, wenn die ausgekeimten Pilzfäden eine Länge von ungefähr 70—200 μ erreicht hatten. Dieses Verfahren bot zugleich bei der Ermittlung der Versuchsergebnisse den Vorteil guter Übersichtlichkeit, indem bei einigermaßen gleichmäßiger Verteilung der Sporen sich die ausgekeimten Schläuche nicht ineinander verflochten. Übrigens wurde bei einigen Versuchen mit *Aspergillus niger* auch das Verhalten älterer Entwicklungsphasen berücksichtigt.

Sämtliche Objekte wuchsen im Wärmezimmer des hiesigen Instituts bei einer Temperatur von $+ 27^0$ C. in den noch näher anzugebenden Nährlösungen, wobei zu berücksichtigen war, daß das Wachstum mit zunehmender Konzentration verlangsamt wird[2]). So hatte z. B. *Aspergillus niger*, wenn er in 1-proz. Traubenzuckerlösung kultiviert wurde, bereits nach 17—20 Stunden einen Keim-

1) Eschenhagen, a. a. O.; v. Mayenburg, Lösungskonzentration und Turgorregulation bei den Schimmelpilzen. Jahrb. f. wiss. Bot., 1901, Bd. XXXII, S. 381; Pantanelli, Zur Kenntnis der Turgorregulationen bei Schimmelpilzen. Jahrb. f. wiss. Bot., 1904, Bd. XXXV, S. 303.

2) Eschenhagen, a. a. O., S. 10.

schlauch gebildet, während dies in 20-proz. Lösung erst in 24 bis 26 Stunden und in 50-proz. Lösung in 35—40 Stunden der Fall war.

Die Zusammensetzung der Nährlösungen war folgende:

4,0 g Ammoniumnitrat, 2,0 g Kaliummonophosphat, 0,2 g Magnesiumsulfat, 0,1 g Calciumchlorid und 1 Tropfen Eisenchloridflüssigkeit wurden auf 1 l destilliertes Wasser gelöst. Zu dieser anorganischen Lösung erfolgte ein Zusatz, der entweder aus Traubenzucker oder Glyzerin oder Salpeter (Kali- und Natronsalpeter in molekularem Verhältnis) bestand, wobei im letztgenannten Falle noch 0,5 % Traubenzucker als Kohlenstoffquelle hinzugefügt wurde. Die Konzentrationsverhältnisse der drei vorgenannten Substanzen werden bei den Versuchen näher angegeben werden. Alle Nährlösungen waren klar und zeigten schwach saure Reaktion.

Was die Kulturgefäße anbelangt, so war es für die Art der Versuchsanstellung von Wichtigkeit, dieselben auf ein möglichst geringes Volumen zu beschränken, um zu erzielen, daß die Nährlösung rasch die Temperatur ihrer Umgebung annahm. Anfangs versuchte ich dies zu erreichen durch die Verwendung gläserner Ringkammern, die in bekannter Weise eine Hängetropfenkultur enthielten und in einem verschlossenen Glaszylinder der Kälte ausgesetzt wurden. Hierbei zeigten die Hängetropfen eine weitgehende Unterkühlung, und nur bei der Einwirkung von Temperaturen, die erheblich unter dem Gefrierpunkte der Nährlösung lagen, trat ein Erstarren derselben ein. Es ist nun aber, wie wir später des näheren erfahren werden, für die Resultate unserer Versuche nicht gleichgültig, ob die Nährlösung gefroren oder nur unterkühlt war, so daß ich in der Lage sein mußte, die Unterkühlung je nach Erfordernis vermeiden zu können. Dies gelang in einfacher Weise, indem ich Reagenzröhrchen als Kulturgefäße benutzte. Hierbei verfuhr ich folgendermaßen: Die Röhrchen, deren Durchmesser 13 mm und deren Länge 13 cm betrug, wurden mit je 1 ccm Nährlösung beschickt und mittels Wattepfropfens verschlossen. Nach der Sterilisation erfolgte die Impfung mit Sporen, die vorher durch anhaltendes Schütteln in steriler Nährlösung gleichmäßig verteilt worden waren. Indem ich dann mittels einer sterilen Platinöse je einen Tropfen einer derartigen Aufschwemmung dem Inhalt der einzelnen Reagenzröhrchen hinzufügte, erreichte ich leicht, daß jeder Tropfen Nährlösung nur wenige Sporen in übersichtlicher Weise enthielt. Vor jedem Versuch überzeugte ich mich unter dem Mikroskop von der erfolgten Keimung und dem intakten Aussehen

der Objekte. Wurden nun die Kulturen der Kälte ausgesetzt, so konnte ich eine Unterkühlung des Substrats dadurch vermeiden, daß ich kurz bevor die Temperatur auf Null gesunken war, mittels einer Pinzette ein Körnchen Eis der Nährlösung hinzufügte; letztere erstarrte dann sofort, sobald ihr Gefrierpunkt erreicht war, was bei meinen Experimenten in spätestens 3 Minuten eintrat. Alsdann dauerte es noch einige Zeit, ehe im Zentrum der gefrorenen Nährlösung die jeweilige Versuchstemperatur erreicht war, und zwar war dies je nach der höheren oder tieferen Lage der letzteren in 10 bis 25 Minuten der Fall. Dagegen ging bei Unterkühlung der Nährlösung (also beim Ausbleiben des Gefrierens) die Einstellung der Temperatur im Innern des Substrats mit der Außentemperatur ziemlich rasch vor sich und war stets in 3—8 Minuten erfolgt.

Jeder Versuch wurde gleichzeitig mit mehreren Kulturen ausgeführt, wozu die Reagenzröhrchen in enger kreisförmiger Anordnung mittels einer siebartig durchlöcherten Korkplatte in der Weise fixiert wurden, daß sie bis dicht unter ihren oberen Rand in eine Kältemischung tauchten, während in der Mitte zwischen diesen Röhrchen ein Thermometer angebracht war, dessen unteres Ende sich in gleicher Tiefe mit dem Boden der Gläschen befand.

Die Kältemischung bestand meist aus zerkleinertem Eis und Chlornatrium (Staßfurter Salz). Durch mehr oder minder reichliche Beimengung des letzteren konnte ich die verschiedensten Temperaturen bis — 21 ° C. erzeugen. Wandte ich an seiner Statt kristallisiertes Chlorcalcium ($CaCl_2 + 6\ H_2O$) an, so gelang es, noch tiefere Kältegrade (bis — 26 ° C.) zu erreichen.

Es war nun noch darauf Bedacht zu nehmen, die erzielten Temperaturen nach Möglichkeit konstant zu halten. Zu diesem Zweck stellte ich das die Kältemischung enthaltende Gefäß (von ca. 7 l Inhalt) in eine in ihrem Innern mit Heu ausgekleidete Holzkiste, so daß das Heu sowohl am Boden wie an den Seiten des Gefäßes eine dichte Isolierschicht bildete, während ich eine solche auf der Oberseite durch Auflegen mehrerer Bastdecken herstellte, durch welche nur durch eine kleine Öffnung die in zweckmäßiger Höhe angebrachte Thermometerskala herausragte, an der die Temperatur ohne Lüftung der isolierenden Hülle abgelesen werden konnte. Auf die beschriebene Art und Weise wurde in der Tat erreicht, daß die Temperatur öfters innerhalb eines Zeitraums von 2 Stunden konstant blieb. Häufiger jedoch war ein wenn auch geringes Steigen der Temperatur unvermeidlich. In solchen Fällen

wurden die Kulturen rasch in eine bereit gehaltene frische Kältemischung von der ursprünglichen Temperatur getaucht. Die vorübergehenden Temperatursteigerungen beliefen sich hierbei bis auf — 0,4° C., nur unterhalb von — 20° C. gelegentlich auch bis auf 0,6—0,8° C. Auf derartige immerhin noch leidlich konstante Temperaturen mußte ich jedoch bei Versuchen von längerer Zeitdauer Verzicht leisten.

Zur Methodik der Gefrierversuche ist noch zu bemerken, daß auch der Umstand, daß ein langsames oder schnelles Auftauen für das Leben meiner Objekte eventuell von Bedeutung sein konnte, nicht außer acht gelassen wurde. Sachs[1]) gelangte ja auf Grund verschiedener Untersuchungen zu der Ansicht, daß das Gefrieren für die Pflanzen unschädlich sei, und daß für das Weiterleben oder den Tod nur die Art des Auftauens in Frage komme, indem schnelles Auftauen tödlich wirke, während durch langsames Auftauen die Pflanze vor dem Absterben bewahrt bleibe. Dagegen haben Müller-Thurgau[2]) und Molisch[3]) durch exakte Versuche gezeigt, daß eine Beeinflussung des Lebens durch langsames oder schnelles Auftauen nicht stattfindet bis auf einige Fälle, die neuerdings Mez[4]) zu erklären versuchte. Bei meinen Untersuchungen konnte ich wiederholt feststellen, daß es für die Ergebnisse der Versuche völlig gleichgültig war, ob die gefrorenen Pilzkulturen in einer Temperatur von + 4—6° C. allmählich auftauten, oder ob das Auftauen in einer Temperatur von + 30—35° C. rasch erfolgte. Nachdem diese Ermittlungen feststanden, verfuhr ich in der Folgezeit in der Weise, daß ich die Kulturen nach Beendigung des Gefrierversuchs bei Zimmertemperatur auftauen ließ.

Hieran schloß sich unmittelbar darauf die mikroskopische Untersuchung, bei der es natürlich darauf ankam, lebende und tote Individuen mit Sicherheit voneinander zu unterscheiden. Zum Nachweis des Lebens diente in allen Fällen die Methode der Plasmolyse. Im übrigen bieten lebende Zellen ein intaktes Aussehen dar, während abgestorbene sich durch die Deformation ihres Protoplasten kenntlich machen. Letzterer erscheint kontrahiert oder körnig zerfallen; er

1) Sachs, Landwirtschaftl. Versuchsstationen, 1860, 5. H., S. 177 und Bericht über die Verhandl. d. Kgl. Sächs. Gesellsch. d. Wissensch. zu Leipzig, 1860, S. 40.

2) Müller-Thurgau, Landw. Jahrb., 1880, Bd. 9, S. 517 ff.

3) Molisch, a. a. O., S. 34—47.

4) Mez, Neue Untersuchungen über das Erfrieren eisbeständiger Pflanzen. Flora, 1905, S. 112.

hebt sich meist deutlich von der Zellwand ab und ist leicht zu färben mittels Anilinblau- oder Methylenblaulösung. Von dem zweitgenannten Farbstoff ist zwar bekannt, daß er auf das lebende Protoplasma giftig wirkt, doch konnte eine 0,001-proz. Lösung ohne Nachteil für lebendes Material verwandt werden.

C. Spezieller Teil.

Die jetzt mitzuteilenden Versuche lassen sich in zwei Kategorien trennen, indem wir dabei unterscheiden, ob ein Gefrieren der Nährlösung eintrat oder ob dasselbe infolge Unterkühlung unterblieb. Wir werden unsere näheren Ausführungen mit den Unterkühlungsversuchen beginnen, da letztere ihrem Wesen nach die einfacheren sind, und hieran im darauf folgenden Abschnitt die Gefrierversuche anschließen.

I. Das Erfrieren der Objekte bei Vermeidung der Eisbildung.

Wie bereits oben angedeutet, wenden wir uns in erster Linie der Frage zu, wie die Kälte auf unsere Objekte einwirkt, wenn die Eisbildung infolge Unterkühlung der Nährflüssigkeit vermieden wird.

Was zunächst die Unterkühlung anbelangt, so ist sie ja ein bekanntes physikalisches Phänomen. Sie tritt in Wasser und in Salzlösungen stets ein, wenn die Berührung mit Eis oder andere das Gefrieren beschleunigende Ursachen vermieden werden, und kann unter gewissen Verhältnissen (z. B. in Kapillaren) eine ziemlich ansehnliche sein. So konnte Mousson[1]) feststellen, daß Wasser in einer Kapillare von 0,4 mm Durchmesser bei — 7 bis — 10° C. noch nicht gefror. In analoger Weise fand Dufour[2]), daß Wassertropfen von einigen Millimeter Durchmesser, die in einem Gemisch von gleichem spezifischem Gewicht aus Mandelöl und Chloroform frei schwebten, noch bei — 8 bis — 12° C. flüssig blieben.

Bei meinen Versuchen konnte ich von der Verwendung von Kapillaren absehen. Wie bereits früher erwähnt, wurde 1 ccm Nährflüssigkeit in einem Reagenzröhrchen unterkühlt. Welche Temperaturen hierbei unterhalb des Gefrierpunktes der Nährlösung erreicht wurden, ist in der nachfolgenden Tabelle angegeben.

1) Mousson, Die Physik auf Grundlage der Erfahrung, I. Aufl., 2. Abt., S. 73 und Annalen der Physik und Chemie, 1858, Bd. 105, S. 161.

2) Dufour, Annalen der Physik und Chemie, 1861, Bd. 114, S. 530.

Tabelle I.

Traubenzuckerlösung	Gefrierpunkt	Unterkühlung
1 %	— 0,29° C.	— 6° C.
20 %	— 2,89° „	— 8° „
50 %	— 8,9 ° „	— 14° „

Es wurden nun zunächst Keimschläuche von *Aspergillus niger*, die in 1-proz., bezw. in 20- und 50-proz. Traubenzuckerlösung kultiviert waren, während einer Zeit von 2 Stunden der Einwirkung der in vorstehender Tabelle mitgeteilten Unterkühlungstemperaturen ausgesetzt, wobei in jedem Falle ein Gefrieren der Nährlösung vermieden werden konnte. Hierbei ergab sich, daß niemals eine Schädigung der Objekte eintrat. Auch Kulturen in isotonen Glyzerin- und Salpeterlösungen, die den gleichen Versuchsbedingungen unterworfen wurden, zeigten dasselbe Verhalten. Genau dieselben Versuche wie mit *Aspergillus niger* wurden angestellt mit Keimschläuchen von *Penicillium glaucum*, *Botrytis cinerea* und *Phycomyces nitens*. Auch in allen diesen Fällen erwiesen sich die Objekte nach dem Versuch als lebend. Auf Grund dieser Ergebnisse vermögen wir zu konstatieren, daß die Schimmelpilze imstande sind, in unterkühlter Nährlösung vorübergehende Einwirkungen ziemlich niedriger Temperaturen zu vertragen.

Auf die Dauer aber wird sich kaum ein pflanzlicher Organismus am Leben erhalten können unter Bedingungen, die ein Wachstum und eine Vermehrung nicht gestatten. Demgemäß war schließlich von vornherein eine Schädigung unserer Objekte zu erwarten bei längerem Verweilen in Temperaturen unterhalb des Wachstumsminimums. Es fragte sich nur, wie lange unsere Objekte in unterkühlter Nährlösung der Kälte Widerstand zu leisten vermögen. Einige Versuche mit Keimschläuchen von *Aspergillus niger* sollen uns hierüber Aufschluß geben.

Zu bemerken ist, daß ich davon absehen mußte, die Temperatur während längerer Zeit konstant zu halten, was bei der Beurteilung der Resultate zu berücksichtigen ist. Einen Überblick über den jedesmaligen Temperaturverlauf erhält man aus den in den nachfolgenden Protokollen mitgeteilten Ablesungen. Bei Versuch 3 (Tab. IV) habe ich wegen seiner langen Dauer nur die Grenzen angegeben, innerhalb welcher die Temperatur während 24 Stunden schwankte.

Tabelle II.

Versuch 1.

Objekt: *Aspergillus niger.*

Nährlös.: 1 % Traubenzucker.

Zeit	Temperatur ° C.	Resultat der Untersuch.
9 Uhr Vorm.	— 6,0	
11 „ „	— 5,8	
1 „ Nachm.	— 5,0	
3 „ „	— 6,0	
6 „ „	— 5,2	Alle Obj. lebend
Nacht	—	
8½ Uhr Vorm.	— 0,6	30 % abgestorben
9 „ „	— 5,8	
11 „ „	— 5,2	
1 „ Nachm.	— 4,8	
3 „ „	— 6,0	
5 „ „	— 5,6	70 % abgestorben

Tabelle III.

Versuch 2.

Objekt: *Aspergillus niger.*

Nährlös.: 20 % Traubenzucker.

Zeit	Temperatur ° C.	Resultat der Untersuch.
9 Uhr Vorm.	— 7,0	
11 „ „	— 6,8	
1 „ Nachm.	— 7,0	
3 „ „	— 6,2	
5 „ „	— 6,0	
6 „ „	— 8,0	
Nacht	—	
8½ Uhr Vorm.	— 2,2	Alle Obj. lebend
9 „ „	— 6,8	
11 „ „	— 6,4	
1 „ Nachm.	— 6,2	
3 „ „	— 5,4	
6 „ „	— 8,0	20 % abgestorben
Nacht	—	
9½ Uhr Vorm.	— 2,4	90 % abgestorben

Tabelle IV.

Versuch 3. Objekt: *Aspergillus niger.*

Nährlösung: 50 % Traubenzucker.

Zeit	Temperatur ° C.	Resultat der Untersuchung
1. Tag	— 12,0 bis — 6,2	
2. „	— 11,4 „ — 5,8	
3. „	— 11,8 „ — 6,5	
4. „	— 12,0 „ — 5,7	Objekte lebend (nach 3 Tagen)
5. „	— 11,0 „ — 6,0	„ „ „ 4 „
6. „	— 11,4 „ — 6,2	15 % abgestorben „ 5 „
7. „	— 13,0 „ — 4,2	40 % „ „ 6 „
8. „	— 11,2 „ — 6,0	50 % „ „ 7 „
9. „	— 11,0 „ — 5,8	75 % „ „ 8 „

Aus den vorstehenden Versuchen geht hervor, daß unsere Objekte, die in unterkühltem Zustande vorübergehend Temperaturen unter 0 vertragen, dies auf die Dauer nicht vermögen, sondern im Laufe von 24 Stunden oder mehreren Tagen absterben. Es zeigt

dieses Verhalten, wie trotz der fehlenden Eisbildung eine Pflanze in mehr oder weniger kurzer Zeit erfrieren kann. Molisch hat diesen Vorgang, für den er die Bezeichnung „Erkältung" vorschlägt[1]) (zum Unterschiede von dem mit einer Eisbildung verbundenen „Gefriertode"), bei den bereits in der Einleitung erwähnten Versuchspflanzen konstatiert, ebenso wie Pfeffer[2]) gelegentlich beobachtete, daß die Keimwurzel von *Cucurbita pepo* und *Phaseolus vulgaris* teilweise abgestorben war, nachdem sie 4 Wochen lang in einer Temperatur zwischen 0 bis + 1° C. verweilt hatte. Auch Göppert[3]) gibt bereits an, daß verschiedene Pflanzen, die vorübergehend — 2° bis — 3° C. vertragen, zugrunde gehen, wenn sie während 24 bis 48 Stunden bei — 1° C. gehalten werden, also in einer Temperatur, in der, wie Pfeffer bemerkt[4]), voraussichtlich die Eisbildung in der Pflanze unterblieb.

Wenn wir den Verlauf unserer mitgeteilten Versuche näher betrachten, so fällt uns sofort die ungleiche Kälteresistenz auf, welche die Objekte in Lösungen verschiedener Konzentration zeigen. Während die in 1-proz. Traubenzuckerlösung gewachsenen Keimschläuche bereits nach 32 Stunden größtenteils abgestorben sind, ergeben die in 20-proz. Lösung kultivierten Individuen ein ähnliches Resultat erst nach 2 Tagen, trotzdem sie einer niedrigeren Temperatur ausgesetzt waren; denn im ersten Versuch (Tab. II) schwankt die Temperatur zwischen — 0,6 und — 6° C., im zweiten dagegen zwischen — 2,2 und — 8° C. Noch größer ist die Steigerung der Kälteresistenz bei dem in 50-proz. Traubenzuckerlösung gewachsenen *Aspergillus*. Hier schwankt die Temperatur zwischen — 4,2 und — 13° C. Die Objekte aber halten dieser Einwirkung relativ lange Zeit stand. Erst am 6. Tage macht sich der Beginn des Absterbens bemerkbar, bis schließlich am 9. Tage der größere Teil der Individuen sich als tot erweist.

Wir konstatieren also, daß die Erhöhung der Konzentration der Nährlösung in unserem Falle eine gesteigerte Kälteresistenz zur Folge hat. Offenbar ist hier die Resistenzfähigkeit in günstiger Weise beeinflußt worden, ohne daß wir jedoch mit Sicherheit angeben können, auf welchen Ursachen dieser Vorgang beruht.

1) Molisch, a. a. O., S. 49.
2) Pfeffer, Pflanzenphysiologie, II. Aufl., (1904), Bd. II, S. 298.
3) Göppert, a. a. O., S. 63.
4) Pfeffer, a. a. O., S. 298.

II. Das Erfrieren der Objekte bei Eisbildung in der Nährlösung.

1. Die Bedeutung der Eisbildung für die Kälteresistenz und der Einfluß der erhöhten osmotischen Leistung auf die Lage des Erfrierpunktes.

Nachdem wir nun im vorhergehenden Abschnitt erfahren haben, wie sich unsere Objekte gegen die Kälte verhielten, wenn eine Eisbildung unterblieb, wird es jetzt unsere Aufgabe sein, unsere Versuche durch ein Gefrieren der Nährlösung zu komplizieren, um auf diese Weise zunächst zu ermitteln, ob die Eisbildung für die Kälteresistenz unserer Objekte von Bedeutung ist. Hierbei haben wir natürlich zu berücksichtigen, ob die Eisbildung nur in der Nährlösung eintritt oder ob auch ein Gefrieren der Zellflüssigkeit des Pilzes erfolgt.

Ein Gefrieren der Nährlösung bei ihrem Gefrierpunkt ist, wie ich vorausschicken will, während einer Versuchszeit von 2 Stunden für das Leben des Pilzes ungefährlich. In keinem Falle konnte ich, wie aus den später mitzuteilenden Versuchen hervorgehen wird, hierbei eine Schädigung der Objekte konstatieren. Die Lage des Gefrierpunktes der Nährlösung ist demnach von geringer Bedeutung, was ja dadurch begreiflich wird, daß die osmotische Leistung der Pilzzelle die des Substrats übertrifft[1]), und demnach die Gefriertemperatur des Zellsaftes unter dem Gefrierpunkte der Nährlösung liegen muß. Das Gefrieren der Nährlösung spielt aber dann eine Rolle, wenn ein gewisses Temperaturminimum erreicht ist, denn ich konnte durch öfters wiederholte Vorversuche feststellen, daß Keimschläuche von *Aspergillus niger*, die in 1-proz. Traubenzuckerlösung gewachsen waren, sich sämtlich als abgestorben erwiesen, nachdem sie 2 Stunden bei einer Temperatur von — 4 bis — 6° C. in der gefrorenen Nährlösung verweilt hatten, also bei Temperaturen, die sie, wie wir bereits wissen, im unterkühlten Nährmedium während einer gleichen Versuchszeit zu ertragen vermögen.

Während wir aber bis jetzt nur das Gefrieren der Nährlösung in Betracht zogen, wird es nun für das Verständnis des Erfrierprozesses von Wichtigkeit sein, auch das Gefrieren der Objekte näher ins Auge zu fassen. Wird vor allem bei diesem Vorgang eine Eisbildung innerhalb der Pilzzelle erfolgen? Diese Frage läßt

1) Eschenhagen, a. a. O., S. 15.

sich eigentlich nur durch eine direkte Beobachtung des Gefriervorganges unter dem Mikroskop entscheiden, wie es Müller-Thurgau[1]) und Molisch[2]) mit geeigneten Objekten ausführten; ich habe aber von dieser Methode wegen der geringen Größe meiner Versuchsobjekte Abstand genommen. Alle Erfahrungen, die bis jetzt bei den Untersuchungen über das Erfrieren von Pflanzen gemacht wurden, haben gezeigt, daß normalerweise in der Pflanzenzelle kein Eis gebildet wird, sondern daß die Eisbildung außerhalb der Zelle auf der Oberfläche der Zellhäute stattfindet[3]). Bei unseren Objekten dürfte der Gefriervorgang in analoger Weise stattfinden, wie ihn Molisch beobachtete, als er einen *Spirogyra*-Faden in Wasser gefrieren ließ[4]). Hierbei gefror zunächst das Einbettungswasser. Die Eiskristalle drangen Wolken gleich in dem Gesichtsfeld vor, bis sie unter reichlichem Abscheiden von Luftbläschen die *Spirogyra* völlig umschlossen. Stellte der Autor auf den Faden scharf ein, so bemerkte er deutlich, wie die Zellen binnen einer Minute oder in kürzerer Zeit mehr und mehr schrumpften, indem ihnen von dem die Zelle umgebenden Eis das Wasser entzogen wurde. In gleicher Weise wird bei unseren Objekten das den Pilzfaden umgebende Eis der Nährlösung als Attraktionszentrum wirken, indem es bei einer gewissen Temperatur der Zelle Wasser entzieht, welches außerhalb der Membran gefriert. Ob und wann außerdem vielleicht auch eine Eisbildung innerhalb der Pilzzelle Platz greift, diese Frage müssen wir als eine offene betrachten.

Was nun die beim Gefrieren von Pflanzen stattfindende Wasserentziehung anbelangt, so ist sie bekanntlich von Molisch[5]), ebenso wie bereits früher von Müller-Thurgau[6]), als die Ursache des Gefriertodes angesehen worden. Beide Autoren betrachten also den Gefriertod gewissermaßen als einen Austrocknungstod. Da wird es nun unsere Aufgabe sein, zu untersuchen, ob diese Erklärung für das Erfrieren von Schimmelpilzen zutreffend ist. Um der Entscheidung dieser Frage näher zu kommen, werden wir einerseits die Temperatur feststellen, bei welcher aus dem Zellsaft Wasser

1) Müller-Thurgau, Landw. Jahrb., 1880, Bd. 9, S. 134 u. 1886, Bd. 15, S. 453.

2) Molisch, a. a. O., S. 3.

3) Müller-Thurgau, a. a. O., S. 481; Molisch, a. a. O., S. 29; Pfeffer, a. a. O., S. 306 ff.

4) Molisch, a. a. O., S. 22.

5) Molisch, a. a. O., S. 26.

6) Müller-Thurgau, 1886, a. a. O., S. 534.

ausfriert, anderseits aber den spezifischen Erfrierpunkt unserer Objekte bestimmen und schließlich beide Temperaturen miteinander vergleichen.

Die Temperatur, bei welcher dem Zellsaft durch das die Zelle umgebende Eis der Nährlösung Wasser entzogen wird, ist abhängig von der osmotischen Leistung des Zellsaftes und dürfte bis auf gewisse Differenzen, von denen noch die Rede sein wird, annähernd übereinstimmen mit dem Gefrierpunkt, den wir für den ausgepreßten Zellsaft auf kryoskopischem Wege mit Hilfe des Gefrierapparates finden müßten. Diese Gefrierpunktsbestimmung des Zellsaftes wurde bei Schimmelpilzen von Pantanelli versucht, ist aber bei diesen Objekten mit derartigen Schwierigkeiten verknüpft, daß sie keine exakten Werte liefert[1]). Aber selbst dann, wenn das Gegenteil der Fall sein sollte, würde doch, wie wir bereits oben andeuteten, der ermittelte Gefrierpunkt noch nicht ganz der Temperatur entsprechen, bei der voraussichtlich dem Zellsaft durch das die Zelle umgebende Eis der Nährlösung Wasser entzogen wird. Diese Temperatur wird vielmehr etwas tiefer liegen zufolge der in der vitalen Zelle herrschenden Druck- und Kapillaritätsverhältnisse. Nun können wir noch auf einem anderen Wege zu einer annähernden Bestimmung des Gefrierpunktes des Zellsaftes gelangen, wenn wir mit Hilfe der Plasmolyse den Turgor ermitteln und den Gefrierpunkt der den plasmolytischen Wert angebenden Lösung bestimmen. Dagegen läßt sich einwenden, daß der Turgor nicht allein aus osmotischem Druck, sondern auch aus Zentraldruck und Quellungskraft resultiert. Hierauf entgegnen wir folgendes: Den Zentraldruck können wir vernachlässigen, da er, wie Pantanelli gezeigt hat[2]), bei Schimmelpilzen einen sehr geringen Wert besitzt. Wenn wir dann immer noch den Gefrierpunkt anscheinend zu niedrig finden, so wird diese Differenz wahrscheinlich kompensiert durch die in der vitalen Zelle herrschenden Druck- und Kapillaritätsverhältnisse, das heißt, wir werden keinen großen Fehler begehen, wenn wir den Gefrierpunkt der den Turgor angebenden plasmolysierenden Lösung als identisch betrachten mit der Temperatur, bei der voraussichtlich dem Zellsaft durch das die Zelle umgebende Eis der Nährlösung Wasser in größerer Menge entzogen wird.

Mit den näheren Untersuchungen über den Gefriertod unserer Objekte konnte gleichzeitig auch die Behandlung unserer zweiten

1) Pantanelli, a. a. O., S. 307.
2) Pantanelli, a. a. O., S. 311.

in der Einleitung erwähnten Frage verquickt werden, ob nämlich die Erhöhung der osmotischen Leistung auf die Kälteresistenz von Schimmelpilzen von günstigem Einfluß sei.

Wie ich bereits früher andeutete, können durch eine Steigerung der Konzentration der Nährlösung recht ansehnliche Turgorwerte erreicht werden. Während z. B. in meinen Kulturen der Turgor des in 1-proz. Traubenzuckerlösung gewachsenen *Aspergillus* einer Lösung von 9 % $NaNO_3$ entsprach, erreichte er bei den in 50-proz. Traubenzuckerlösung kultivierten Individuen die stattliche Höhe von 38,5 % $NaNO_3$. Ähnliche Werte erhielt Eschenhagen[1]), der diese Verhältnisse zum ersten Mal genauer untersuchte.

Was nun den Einfluß dieser Erhöhung der osmotischen Leistung auf die Lage des Erfrierpunktes anbetrifft, so unternahm ich auch zunächst einen Vorversuch.

Keimschläuche von *Aspergillus niger*, die einerseits in 1-proz., anderseits in 50-proz. Traubenzuckerlösung gewachsen waren, wurden gleichzeitig während einer Zeit von 2 Stunden einer Temperatur von — 12° C. ausgesetzt. Die Nährlösung war hierbei wie in allen folgenden Versuchen gefroren. Nach dem Auftauen ergab sich nun das interessante Resultat, daß die in der 1-proz. Lösung gezüchteten Objekte sich sämtlich als abgestorben erwiesen, was ja nach den früheren Versuchen zu erwarten war, während in dem Substrat von der höheren Konzentration eine Schädigung der Kulturen nicht konstatiert werden konnte. Dieser bedeutungsvolle Versuch wurde noch oft wiederholt mit dem Unterschiede, daß ich jetzt auch Temperaturen von — 15 und — 20° C. auf die Objekte einwirken ließ. Hierbei resultierte stets das beim ersten Mal erhaltene Ergebnis.

Nach den günstigen Resultaten unserer Vorversuche lag nun nichts näher, als die Objekte außer in den bereits angewandten Kulturflüssigkeiten auch in einigen Zwischenkonzentrationen zu kultivieren und in jeder Konzentration durch eine Reihe von Versuchen den Gefrierpunkt und den Erfrierpunkt der Versuchsobjekte zu bestimmen, um so eine Entscheidung unserer vorerwähnten Fragen herbeizuführen.

Wie aus den nachstehenden Tabellen ersichtlich ist, erfolgten die Versuche bei fast allen Temperaturgraden von — 1 bis — 26° C.

1) Eschenhagen, a. a. O., S. 22.

Tabelle V[1]).

Versuchsobjekt: *Aspergillus niger*. Nährlösung: Traubenzucker.
Versuchszeit: 2 Std.

Temperatur ° C.	Konzentration 1 % △ = −0,29° C.	10 % △ = −1,30° C.	20 % △ = −2,89° C.
−1	Alle Objekte lebend	—	—
−2	80 % tot	Alle Objekte lebend	—
−3	Alle Objekte tot	30 % tot	Alle Objekte lebend
−4	—	90 % „	do.
−5	—	—	do.
−6	—	—	15 % tot
−7	—	—	40 % „
−8	—	—	60 % „
−9	—	—	85 % „
−10	—	—	100 % „

Tabelle VI.

Versuchsobjekt: *Aspergillus niger*. Nährlösung: Traubenzucker.
Versuchszeit: 2 Std.

Temperatur ° C.	Konzentration 30 % △ = −4,0° C.	40 % △ = −6,7° C.	50 % △ = −8,9° C.
−11	Alle Objekte lebend	Alle Objekte lebend	Alle Objekte lebend
−12	10 % tot	do.	do.
−13	35 % „	do.	do.
−14	70 % „	do.	do.
−15	90 % „	do.	do.
−16	100 % „	do.	do.
−17	—	15 % tot	do.
−18	—	25 % „	do.
−19	—	40 % „	do.
−20	—	45 % „	do.
−21	—	60 % „	do.
−22	—	80 % „	do.
−24	—	95 % „	do.
−26	—	100 % „	do.

1) Das Zeichen △ bedeutet den Gefrierpunkt der Nährlösung. Die Bestimmung des letzteren erfolgte mit einem in $^1/_{100}$-Grade geteilten Thermometer, wenn die Zahlen bis auf die zweite Dezimale angegeben sind. Andernfalls wurde ein nur mit $^1/_5$-Gradteilung versehenes Thermometer benutzt, so daß die auf diese Weise erhaltenen Zahlen nur annähernd richtig sind, für unsere Zwecke aber genügen dürften.

Die mitgeteilten Versuche zeigen, daß stets mit zunehmender Konzentration der Nährlösung eine Erniedrigung des Erfrierpunktes zu konstatieren war. Zu bemerken ist, daß auch in ein und derselben Konzentration die Objekte trotz gleicher Entwicklung ein ungleiches Verhalten aufwiesen, indem einige bereits bei Temperaturen abstarben, bei denen andere noch am Leben blieben. So gingen z. B. einige der in 20-proz. Traubenzuckerlösung kultivierten Keimschläuche von *Aspergillus niger* bereits bei — 6° C. zugrunde, während ungefähr die gleiche Anzahl noch eine Temperatur von — 9° C. aushielt. Es erscheint nicht ausgeschlossen, daß dieses ungleiche Verhalten wenigstens zum Teil dadurch veranlaßt wird, daß die tödliche Temperatur, wie wir bereits früher erwähnten, an der Peripherie der gefrorenen Nährlösung 10—25 Minuten eher einwirkt als im Zentrum, so daß die im letzteren befindlichen Individuen weniger lange der in Frage kommenden Temperatur ausgesetzt sind und deshalb scheinbar mehr aushalten. Mit Berücksichtigung dieses unangenehmen Umstandes habe ich diejenige Temperatur als den spezifischen Erfrierpunkt bezeichnet, bei der eben noch die überwiegende Anzahl der Objekte abstarb.

Wir wollen nun die durch die Versuche ermittelten Erfrierpunkte unserer in Nährlösungen verschiedener Konzentration kultivierten Objekte mit den Gefrierpunkten der plasmolysierenden Lösungen vergleichen, also mit denjenigen Temperaturen, bei welchen voraussichtlich dem Zellsaft durch Ausfrieren Wasser entzogen wird. Die folgende Tabelle gewährt eine Übersicht über die Erfrierpunkte der Objekte und die Gefrierpunkte der plasmolysierenden Grenzlösungen.

Tabelle VII[1]).

Versuchsobjekt: *Aspergillus niger*. Nährlösung: Traubenzucker.

C	E	P	Δ p
1 %	— 2° C.	9	— 3,3° C.
10 %	— 4° „	16	— 5,6° „
20 %	— 9° „	24	— 8,2° „
30 %	— 14° „	30,5	— 10,2° „
40 %	— 22° „	36,5	— 11,9° „
50 %	Objekte lebend	38,5	— 12,5° „

1) C = Konzentration der Nährlösung, E = Erfrierpunkt der Objekte, P = plasmolysierende Grenzlösung in Prozenten von $NaNO_3$, Δ p = Gefrierpunkt von P.

Beginnen wir unsere Betrachtungen mit den in 50-proz. Traubenzuckerlösung kultivierten Individuen. Wie aus Tab. VI ersichtlich, erwiesen sich dieselben außerordentlich resistent, indem sie selbst eine Temperatur von — 26° C. innerhalb der zweistündigen Versuchszeit aushielten. Demnach sind sie befähigt, eine beim Gefrieren erfolgende Wasserentziehung zu vertragen, denn der Gefrierpunkt der plasmolysierenden Lösung, die den Turgor angibt, liegt bereits bei — 12,5° C. Analog verhalten sich die in 40- und 30-proz. Lösung gewachsenen Pilze, wobei mit abnehmender Konzentration der Kulturflüssigkeit der Erfrierpunkt sich immer mehr dem Gefrierpunkt der plasmolysierenden Lösung nähert. Bei den in 20-proz. Lösung kultivierten Objekten liegt der Erfrierpunkt nur wenig unter dem Gefrierpunkte der den Turgor angebenden Salpeterlösung. In diesem Falle scheint der beim Gefrieren der Objekte erfolgende Wasserentzug tödlich zu wirken. Ein recht merkwürdiges Verhalten zeigen die in 1- und 10-proz. Lösung gewachsenen Keimschläuche, denn ihr Erfrierpunkt liegt noch über dem Gefrierpunkte der plasmolysierenden Lösung, also über der Temperatur, bei welcher voraussichtlich erst eine erhebliche Wasserentziehung in Frage kommt. Hier wirkt demnach bereits die Eisbildung in der Nährlösung schädlich, jedoch nur dann, wenn ein gewisses Temperaturminimum erreicht ist, da das Gefrieren der Nährlösung bei etwas höherer Temperatur nicht schadet, während anderseits in unterkühlter Lösung noch eine Temperatur unter dem ermittelten Erfrierpunkte vertragen wird. Es dürfte schwierig sein, das ersterwähnte Verhalten zu erklären. Ob vielleicht eine Eisbildung innerhalb der Zellhaut die Plasmahaut schädigt oder ob in anderer Weise ein tödlicher Effekt erzielt wird, muß ich zurzeit unentschieden lassen.

Auf Grund der mitgeteilten Ergebnisse vermögen wir nun bezüglich der Wasserentziehung zu konstatieren, daß letztere nicht unbedingt den Tod der Objekte zur Folge haben muß, daß vielmehr in gewissen Fällen die beim Gefrieren erfolgende Wasserentziehung vertragen wird, während anderseits der Tod eintreten kann, ohne daß die Temperatur, bei der aus der Pilzzelle Wasser ausfrieren wird, erreicht ist.

Aus unseren letzten Erfahrungen ergibt sich auch die Beantwortung unserer zweiten Frage bezüglich der Erhöhung der Kälteresistenz durch die gesteigerte osmotische Leistung der Zelle. Wie wir sehen, sinkt der Erfrierpunkt mit der Zunahme des Turgors, doch besteht gewöhnlich keine einfache Beziehung zwischen den

Gefrierpunkten der plasmolysierenden Lösungen und den entsprechenden Erfrierpunkten der Objekte. Daraus folgt, daß die Erhöhung der Kältresistenz aus lediglich physikalischen Gründen nicht zu erklären ist, sondern auch auf physiologischen Ursachen beruhen muß.

Soweit lagen unseren bisherigen Ausführungen die mit *Aspergillus niger* gewonnenen Resultate zugrunde. Es war nun auch von Wichtigkeit, die gleichen Versuche mit den übrigen, im methodischen Teil dieser Arbeit bereits erwähnten Versuchsobjekten anzustellen, wobei ich mich jedoch auf drei Nährlösungskonzentrationen, nämlich auf die Lösungen von 1%, 20% und 50% Traubenzuckergehalt beschränkte.

Alle untersuchten Objekte wiesen mit zunehmender osmotischer Leistung ein Sinken des Erfrierpunktes, also eine Steigerung der Kälteresistenz auf. Im einzelnen aber zeigen sie in ihrem Verhalten nicht unbedeutende Differenzen.

Wir betrachten zunächst die mit *Penicillium glaucum* gewonnenen Versuchsergebnisse, die in der folgenden Tabelle dargestellt sind.

Tabelle VIII.

Versuchsobjekt: *Penicillium glaucum*. Nährlösung: Traubenzucker. Versuchszeit: 2 Std.

Temperatur	Konzentration		
° C.	1 % $\triangle = -0{,}29°$ C.	20 % $\triangle = -2{,}89°$ C.	50 % $\triangle = -8{,}9°$ C.
— 1	Alle Objekte lebend	—	—
— 2	10 % tot	—	—
— 3	90 % „	Alle Objekte lebend	—
— 4	100 % „	do.	—
— 5	—	do.	—
— 6	—	20 % tot	—
— 7	—	30 % „	—
— 8	—	85 % „	—
— 9	—	100 % „	—
— 10	—	—	Alle Objekte lebend
— 20	—	—	do.
— 22	—	—	do.
— 24	—	—	do.
— 26	—	—	do.

Wird *Penicillium* in 1-proz. Traubenzuckerlösung kultiviert, so liegt sein Erfrierpunkt um 1° C. tiefer als bei *Aspergillus*. Dagegen ist letzterer in 20-proz. Lösung etwas resistenter als *Penicillium* in dem gleichen Substrat. In gleicher Weise aber wie bei *Aspergillus* vermögen die in 50-proz. Lösung gewachsenen Keimschläuche von *Penicillium* noch eine zweistündige Einwirkung von — 26° C. zu vertragen.

Geringer wie bei *Aspergillus niger* und *Penicillium glaucum* ist die Steigerung der Kälteresistenz bei *Botrytis cinerea*, was sich aus der folgenden Tabelle ergibt.

Tabelle IX.

Versuchsobjekt: *Botrytis cinerea*. Nährlösung: Traubenzucker.
Versuchszeit: 2 Std.

Temperatur	Konzentration		
° C	1 % $\Delta = -0{,}29°$ C.	20 % $\Delta = -2{,}89°$ C.	50 % $\Delta = -8{,}9°$ C.
— 1	Alle Objekte lebend	—	—
— 2	90 % tot	—	—
— 3	100 % „	Alle Objekte lebend	—
— 4	—	90 % tot	—
— 5	—	100 % „	—
— 6	—	—	—
— 7	—	—	—
— 8	—	—	—
— 9	—	—	—
— 10	—	—	—
— 15	—	—	Alle Objekte lebend
— 17	—	—	do.
— 18	—	—	do.
— 19	—	—	10 % tot
— 20	—	—	30 % „
— 21	—	—	90 % „
— 22	—	—	100 % „

Hier liegt der Erfrierpunkt der in 50-proz. Traubenzuckerlösung gezüchteten Objekte bereits bei — 21° C. und bei den in 20-proz. Lösung kultivierten Individuen schon bei — 4° C., während die in 1-proz. Lösung gewachsenen Keimschläuche sich ähnlich wie die von *Aspergillus* verhalten.

Noch weniger resistent als *Botrytis cinerea* erwies sich *Phycomyces nitens*, wie die folgende Tabelle zeigt.

Tabelle X.

Versuchsobjekt: *Phycomyces nitens.* Nährlösung: Traubenzucker. Versuchszeit: 2 Std.

Temperatur ° C.	Konzentration 1 % $\Delta = -0{,}29°$ C.	20 % $\Delta = -2{,}89°$ C.	50 % $\Delta = -8{,}9°$ C.
— 0,5	Alle Objekte lebend	—	—
— 1	80 % tot	—	—
— 2	100 % „	—	—
— 3	—	Alle Objekte lebend	—
— 4	—	75 % tot	—
— 5	—	100 % „	—
— 7	—	100 % „	—
— 9	—	100 % „	—
— 11	—	—	Alle Objekte lebend
— 12	—	—	15 % tot
— 13	—	—	40 % „
— 14	—	—	90 % „
— 15	—	—	100 % „

Bei diesem Pilz genügt bereits eine Temperatur von — 1° C., um die in 1-proz. Traubenzuckerlösung kultivierten Keimschläuche zum Absterben zu bringen. Bei einer Erhöhung der Konzentration der Nährlösung auf 20 % Traubenzucker erniedrigt sich der Erfrierpunkt nur um 3° C. und die in 50-proz. Lösung gewachsenen Individuen erfrieren größtenteils schon bei — 14° C.

Vergleichen wir nun an der Hand der folgenden Tabelle bei den drei zuletzt untersuchten Pilzen die Erfrierpunkte der Objekte mit den Gefrierpunkten der plasmolysierenden Lösungen.

Tabelle XI[1]). Nährlösung: Traubenzucker.

	C	E	P	Δp
Penicillium glaucum	1 %	— 3° C.	9	— 3,3° C.
	20 %	— 8° „	24,5	— 8,3° „
	50 %	lebend	40	— 13,0° „
Botrytis cinerea	1 %	— 2° C.	7,5	— 2,7° „
	20 %	— 4° „	20	— 6,8° „
	50 %	— 21° „	34	— 11,2° „
Phycomyces nitens	1 %	— 1° C.	8	— 2,9° C.
	20 %	— 4° „	21,5	— 7,4° „
	50 %	— 14° „	33	— 10,9° „

1) Für die Erklärung der Abkürzungen gilt die Anmerkung auf S. 73.

In 50-proz. Traubenzuckerlösung liegt auch hier bei jedem Objekt der Erfrierpunkt unter dem Gefrierpunkte der plasmolysierenden Lösung. Die Differenz ist am größten bei *Penicillium*, geringer bei *Botrytis*, am geringsten bei *Phycomyces*. Wenn man zugleich berücksichtigt, daß die genannten Versuchsobjekte bezüglich der Höhe ihres Turgors in dieser Nährlösungskonzentration die gleiche Reihenfolge innehalten, wobei *Penicillium* den höchsten plasmolytischen Wert aufweist, so könnte man zu der Vermutung neigen, daß die größere Resistenz damit in Beziehung stände. Leider sind die Turgordifferenzen viel zu gering, um eine derartige Annahme zu rechtfertigen. Denn selbst im extremsten Falle (beim Vergleich von *Penicillium* mit *Phycomyces)* beträgt der Unterschied im Turgor nur 7% $NaNO_3$, was einer Gefrierpunktserniedrigung von noch nicht einmal 3° C. entsprechen würde, während die Differenz in der Lage der Erfrierpunkte mehr als 12° C. beträgt. Was nun die in 20-proz. Traubenzuckerlösung kultivierten Versuchsobjekte anbelangt, so zeigt *Penicillium* (ähnlich wie *Aspergillus)* eine annähernde Übereinstimmung zwischen dem Gefrierpunkt der plasmolysierenden Lösung und dem Erfrierpunkt. Dagegen erfrieren in derselben Konzentration *Botrytis* und *Phycomyces* und ebenso alle drei letztgenannten Objekte, wenn sie in 1-proz. Lösung kultiviert werden, bei einer Temperatur, die zwischen dem Gefrierpunkte der Nährlösung und dem Gefrierpunkte der plasmolysierenden Lösung liegt. Es tritt also auch in diesen Fällen bereits der Tod ein, bevor voraussichtlich aus der Zelle Wasser ausfriert. Wir konstatieren hier dasselbe Verhalten, welches die in 1- und 10proz. Traubenzuckerlösung gewachsenen Keimschläuche von *Aspergillus* zeigen.

Überblicken wir nun kurz die mit *Penicillium glaucum*, *Botrytis cinerea* und *Phycomyces nitens* bezüglich der Kälteresistenz gewonnenen Erfahrungen, so ergibt sich, daß sie im wesentlichen die mit *Aspergillus niger* erhaltenen Resultate bestätigen.

Unsere Versuche zeigten, daß der relativ rasch eintretende Erfriertod nicht immer bei einer Temperatur erfolgt, bei der voraussichtlich der Zelle eine erhebliche Menge Wasser entzogen wird, während anderseits trotz einer gewissen Wasserentziehung die Objekte am Leben bleiben. Wir können demnach nicht, wie dies Müller-Thurgau[1]) und Molisch[2]) für das Erfrieren von Pflanzen generell

1) Müller-Thurgau, a. a. O., 1886, S. 534.
2) Molisch, a. a. O., S. 26.

behauptet haben, den Erfriertod unserer Objekte schlechthin als einen Austrocknungstod betrachten, obwohl diese Vermutung a priori nahe lag, da wir in den Schimmelpilzen Objekte vor uns haben, die im vegetativen Zustande normalerweise gegen das Austrocknen recht empfindlich sind[1]), während ihre Sporen sowohl gegen das Austrocknen[2]) wie gegen das Erfrieren[3]) sich sehr widerstandsfähig erweisen. Jedenfalls aber bestätigen unsere Versuche eine bekannte physiologische Erfahrung, daß mit der Zunahme des Wassergehaltes die Kälteresistenz vermindert wird. Während z. B. Samen in trockenem Zustande gegen die Kälte widerstandsfähig sind, gehen die Samen vieler Pflanzen, wenn sie beim Quellen Wasser eingelagert haben, leicht durch Erfrieren zugrunde[4]). Von Pilzsporen ist allerdings bekannt, daß sie auch im wasserdurchtränkten Zustande der Kälte bedeutenden Widerstand entgegensetzen[3]). Auch ein von mir mit Konidien von *Aspergillus niger* ausgeführter Versuch deutete darauf hin. Die Konidien wurden, nachdem sie 24 Stunden unter öfterem Umschütteln in Wasser verweilt hatten, 4 Stunden einer Temperatur von — 24 bis — 26° C. ausgesetzt. Nach dem Auftauen des eingefrorenen Konidienmaterials impfte ich dasselbe auf eine 10-proz. Traubenzuckerlösung über und brachte die Kultur in eine Temperatur von + 27° C., worauf ich nach 24 Stunden eine normale Keimung beobachten konnte. Ist aber die Keimung und damit eine Steigerung des Wassergehalts in der Zelle erfolgt, so wird zugleich die Kälteresistenz stark reduziert, wobei sich je nach der Konzentration alle Abstufungen der Frostempfindlichkeit erzielen lassen.

Versuche mit isotonen Lösungen.

Wie aus früheren Untersuchungen hervorgeht[5]) und sich auch durch von mir ausgeführte plasmolytische Versuche bestätigt, zeigen die Schimmelpilze bezüglich der Höhe ihres Turgors in isotonen Nährlösungen verschiedener Qualität nicht erhebliche Differenzen. Es fragte sich nun, ob mit der in Nährlösungen verschiedenster

1) Rabe, Über die Austrocknungsfähigkeit gekeimter Samen und Sporen. Flora, 1905, S. 323.

2) Schröder, Über die Austrocknungsfähigkeit der Pflanzen. Untersuch. a. d. bot. Institut zu Tübingen, Bd. II, 1886—1888, S. 34.

3) Die einschlägige Literatur findet sich in Pfeffers Pflanzenphysiologie, Bd. II, 1904, S. 303.

4) Göppert, a. a. O., S. 43.

5) Eschenhagen, a. a. O., S. 31.

Qualität nach einer Konzentrationssteigerung erfolgenden Erhöhung der osmotischen Leistung auch in jedem Falle eine Steigerung der Kälteresistenz verbunden sei, oder ob vielleicht nur durch eine vorzugsweise Darbietung von Zucker die verminderte Kälteempfindlichkeit bewirkt werde. Um dies zu entscheiden, mußten die Gefrierversuche mit Objekten wiederholt werden, die in isotonen Nährlösungen anderer Qualität kultiviert worden waren. Ich beschränkte mich hierbei auf drei Konzentrationsstufen, die, wie ich kryoskopisch ermittelte, den Lösungen von 1 %, 20 % und 50 % Traubenzuckergehalt entsprachen.

Zunächst stellte ich Versuche an mit Keimschläuchen von *Aspergillus niger*, die in isotonen Glyzerinlösungen gewachsen waren. Die Resultate sind in der folgenden Tabelle mitgeteilt.

Tabelle XII.

Versuchsobjekt: *Aspergillus niger*. Nährlösung: Glyzerin.
Versuchszeit: 2 Std.

Temperatur	Konzentration		
° C.	0,5 % $\Delta = -0{,}30°$ C.	12,0 % $\Delta = -2{,}95°$ C.	27,4 % $\Delta = -8{,}9°$ C.
— 1	Alle Objekte lebend	—	—
— 2	90 % tot	—	—
— 3	100 % „	Alle Objekte lebend	—
— 5	—	do.	—
— 6	—	10 % tot	—
— 7	—	60 % „	—
— 8	—	90 % „	—
— 9	—	100 % „	—
— 10	—	—	Alle Objekte lebend
— 15	—	—	do.
— 20	—	—	do.
— 26	—	—	do.

Wie Tab. XII zeigt, ergaben sich annähernd dieselben Resultate wie bei Kultur der Objekte in Traubenzuckerlösung, unbeschadet des Umstandes, daß bei Darbietung von Glyzerin der Turgor in den höheren Konzentrationsstufen einen etwas geringeren Wert erreicht als bei Kultur in Zuckerlösungen, was sich aus der folgenden Tabelle ergibt.

Tabelle XIII.

Versuchsobjekt: *Aspergillus niger*. Nährlösung: Glyzerin.

C	E	P	Δp
0,5 %	— 2° C.	9	— 3,3° C.
12 %	— 8° „	23	— 7,9° „
27,4 %	lebend	38	— 12,4° „

Anders aber gestalteten sich die Ergebnisse, als ich an Stelle von Glyzerin isotonische Salpeterlösungen verwandte. Die Resultate dieser Versuche zeigt die folgende Tabelle.

Tabelle XIV.

Versuchsobjekt: *Aspergillus niger*. Nährlösung: Salpeter.
Versuchszeit: 2 Std.

Temperatur ° C.	Konzentration		
	0,09 % KNO_3 + 0,075 % $NaNO_3$ Δ = — 0,29° C.	4,34 % KNO_3 + 3,65 % $NaNO_3$ Δ = — 2,88° C.	15,2 % KNO_3 + 12,8 % $NaNO_3$ Δ = — 8,9° C.
— 1	Alle Objekte lebend	—	—
— 2	85 % tot	—	—
— 3	100 % „	Alle Objekte lebend	—
— 4	—	do.	—
— 5	—	30 % tot	—
— 6	—	90 % „	—
— 7	—	100 % „	—
— 8	—	100 % „	—
— 12	—	—	Alle Objekte lebend
— 18	—	—	30 % tot
— 22	—	—	50 % „
— 23	—	—	90 % „
— 26	—	—	100 % „

Zwar tritt auch hier mit zunehmender Konzentration der Nährlösung eine Steigerung der Kälteresistenz ein, doch ist die Resistenzzunahme geringer als bei Kultur der Objekte in den isotonen Traubenzucker- oder Glyzerinlösungen. So gingen die in der mit 50 % Traubenzucker isotonen Salpeterlösung gewachsenen Individuen bei — 23° C. zum größten Teil zugrunde, während sie in der entsprechenden Traubenzuckerlösung bei — 26° C. noch nicht geschädigt wurden. Ferner erhöht sich in der mit 20 % Traubenzucker isotonen Salpeterlösung der Erfrierpunkt der Objekte beim Vergleich mit den Kulturen in 20-proz. Traubenzuckerlösung um

3° C. Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht über die Erfrierpunkte der in den Salpeterlösungen kultivierten Objekte und die Turgorwerte der letzteren.

Tabelle XV.

Versuchsobjekt: *Aspergillus niger*. Nährlösung: Salpeter.

C	E	P	Δ p
0,09 % KNO_3 0,075 % $NaNO_3$	— 2° C.	8	— 2,9° C.
4,34 % KNO_3 3,65 % $NaNO_3$	— 6° C.	22	— 7,5° C.
15,2 % KNO_3 12,8 % $NaNO_3$	— 23° C.	34	— 11,2° C.

Wenn auch die Turgorwerte in den isotonen Salpeterlösungen etwas niedriger ausfallen als in den entsprechenden Zuckerlösungen, so kann doch die Ursache der verminderten Kälteresistenz wohl keine physikalische sein; denn bei näherem Vergleich ergibt sich, daß in einem Falle (in der mit 20 % Traubenzucker isotonen Salpeterlösung) einer Erhöhung des Erfrierpunktes von 2° C. nur eine Gefrierpunktserhöhung der plasmolysierenden Lösung von 0,7° entspricht, während im anderen Falle (in der mit 50 % Traubenzucker isotonen Salpeterlösung) einer Erhöhung des Gefrierpunktes von mehr als 3° C. nur eine Gefrierpunktserhöhung der plasmolysierenden Lösung von 1,3° C. gegenübersteht. Schließlich ist noch zu bemerken, daß in der mit der 1 proz. Traubenzuckerlösung isotonen Salpeterlösung eine Verminderung der Resistenz nicht eintritt, was vielleicht nicht zu verwundern ist, wenn man berücksichtigt, daß diese Lösung relativ viel Traubenzucker (0,5 %) enthält. Denn die Ursache, warum in höheren Salpeterkonzentrationen gegenüber den isotonen Zuckerkonzentrationen eine Verminderung der Kälteresistenz eintritt, ist wahrscheinlich in ernährungsphysiologischen Gründen zu suchen. Ist doch für höhere Pflanzen bereits bekannt, daß die Qualität der Nahrung die Kälteresistenz zu beeinflussen imstande ist, indem z. B. eine überreichliche Stickstoffdüngung die Widerstandsfähigkeit gegen Frost herabsetzt[1]).

Nach diesen Bemerkungen kehren wir wieder zu unseren Versuchen zurück.

Die mit *Aspergillus* gewonnenen Erfahrungen gaben natürlich Veranlassung, auch die übrigen Versuchsobjekte in isotonen Salpeterlösungen zu kultivieren und denselben Versuchen zu unterwerfen.

1) Müller-Thurgau, a. a. O., 1886, S. 545.

Die hierbei erhaltenen Resultate sind aus den folgenden Tabellen ersichtlich.

Tabelle XVI.

Versuchsobjekt: *Penicillium glaucum.* Nährlösung: Salpeter.
Versuchszeit: 2 Std.

Temperatur ° C.	Konzentration		
	0,09 % KNO_3 + 0,075 % $NaNO_3$	4,34 % KNO_3 + 3,65 % $NaNO_3$	15,2 % KNO_3 + 12,8 % $NaNO_3$
	$\Delta = -0{,}29°$ C.	$\Delta = -2{,}88°$ C.	$\Delta = -8{,}9°$ C.
— 1	Alle Objekte lebend	—	—
— 2	20 % tot	—	—
— 3	80 % „	Alle Objekte lebend	—
— 4	100 % „	do.	—
— 5	—	10 % tot	—
— 6	—	40 % „	—
— 7	—	50 % „	—
— 8	—	85 % „	—
— 9	—	100 % „	—
— 10	—	—	Alle Objekte lebend
— 20	—	—	do.
— 22	—	—	do.
— 24	—	—	do.
— 26	—	—	do.

Tabelle XVII.

Versuchsobjekt: *Botrytis cinerea.* Nährlösung: Salpeter.
Versuchszeit: 2 Std.

Temperatur ° C.	Konzentration		
	0,09 % KNO_3 + 0,075 % $NaNO_3$	4,34 % KNO_3 + 3,65 % $NaNO_3$	15,2 % KNO_3 + 12,8 % $NaNO_3$
	$\Delta = -0{,}29°$ C.	$\Delta = -2{,}89°$ C.	$\Delta = -8{,}9°$ C.
— 1	Alle Objekte lebend	—	—
— 2	75 % tot	—	—
— 3	100 % „	Alle Objekte lebend	—
— 4	—	70 % tot	—
— 5	—	95 % „	—
— 6	—	100 % „	—
— 15	—	—	Alle Objekte lebend
— 17	—	—	do.
— 18	—	—	do.
— 19	—	—	30 % tot
— 20	—	—	50 % „
— 21	—	—	100 % „
— 22	—	—	100 % „

Tabelle XVIII.

Versuchsobjekt: *Phycomyces nitens.* Nährlösung: Salpeter.
Versuchszeit: 2 Std.

Temperatur ° C.	Konzentration		
	0,09% KNO_3 + 0,075% $NaNO_3$	4,34% KNO_3 + 3,65% $NaNO_3$	15,2% KNO_3 + 12,8% $NaNO_3$
	$\Delta = -0{,}29°$ C.	$\Delta = -2{,}89°$ C.	$\Delta = -8{,}9°$ C.
— 0,5	Alle Objekte lebend	—	—
— 1	65 % tot	—	—
— 2	100 % „	—	—
— 3	—	Objekte lebend	—
— 4	—	90 % tot	—
— 5	—	100 % „	—
— 11	—	—	Alle Objekte lebend
— 12	—	—	30 % tot
— 13	—	—	50 % „
— 14	—	—	80 % „
— 15	—	—	100 % „

Aus den Versuchen geht hervor, daß im Gegensatz zu dem Verhalten von *Aspergillus niger* die Resistenz der anderen Objekte durch die Qualität der Nährlösung nicht beeinflußt wird, denn es ergaben sich annähernd dieselben Resultate wie bei Kultur der Objekte in den entsprechenden Traubenzuckerlösungen. Was aber den Turgor anbelangt, so ist dieser, wie die folgende Tabelle zeigt, in den Salpeterkulturen nicht selten etwas geringer als in den Zuckerkulturen. Trotzdem ist dieser Umstand auf die Lage des Erfrierpunktes nicht von merklichem Einfluß.

Tabelle XIX. Nährlösung: Salpeter.

	C	E	P	Δp
Penicillium glaucum . .	0,09 % KNO_3 + 0,075 % $NaNO_3$	— 3° C.	9	— 3,3° C.
	4,34 % KNO_3 + 3,65 % $NaNO_3$	— 8° „	24	— 8,2° „
	15,2 % KNO_3 + 12,8 % $NaNO_3$	lebend	39	— 12,7° „
Botrytis cinerea . . .	0,09 % KNO_3 + 0,075 % $NaNO_3$	— 2° C.	7,5	— 2,6° C.
	4,34 % KNO_3 + 3,65 % $NaNO_3$	— 4° „	19	— 6,5° „
	15,2 % KNO_3 + 12,8 % $NaNO_3$	— 21° „	32,5	— 10,8° „

Fortsetzung der Tabelle XIX.

	C	E	P	△p
Phycomyces nitens . .	0,09 % KNO_3 + 0,075 % $NaNO_3$	— 1° C.	8	— 2,9° C.
	4,34 % KNO_3 + 3,65 % $NaNO_3$	— 4° „	20	— 6,8° „
	15,2 % KNO_3 + 12,8 % $NaNO_3$	— 14° „	32	— 10,6° „

Wir konstatieren also, daß in jedem Falle mit der Erhöhung der Konzentration der Nährlösung eine Zunahme der Kälteresistenz unserer Objekte eintritt, ein Effekt, der besonders interessant ist beim Vergleich mit den Erfahrungen, die Rabe[1]) bezüglich der Austrocknungsfähigkeit von Schimmelpilzen gemacht hat. Rabe fand nämlich, daß Keimschläuche von *Aspergillus niger*, die, wie bereits erwähnt wurde, das Austrocknen normalerweise nicht vertragen, sich in konzentrierten Rohr- oder Traubenzuckerlösungen monatelang austrocknen ließen. Dagegen waren die Pilzfäden bei Kultur in isotonen Glyzerin- oder Salpeterlösungen auch in den höchsten Konzentrationen nicht austrocknungsfähig. Im letzteren Falle zeigt sich ein bemerkenswerter Unterschied in dem Verhalten unserer Objekte gegen das Austrocknen und das Erfrieren; denn während beim Austrocknen ein spezifisches Nährmedium erforderlich ist, um durch eine Steigerung der Konzentration eine Zunahme der Widerstandsfähigkeit zu bewirken, ist für die Erhöhung der Kälteresistenz die Qualität des Nährsubstrats meist nur von geringer Bedeutung, so daß in jedem Falle mit zunehmender osmotischer Leistung des Pilzes ein Sinken des Erfrierpunktes verknüpft ist.

2. Die Bedeutung der Entwicklungsphase für die Lage des Erfrierpunktes.

Im folgenden Abschnitt sei mir gestattet, einige Beobachtungen mitzuteilen, die deshalb von Interesse sind, weil sie zeigen, daß die Entwicklungsphase eines Pilzes für die Lage seines Erfrierpunktes nicht gleichgültig ist.

Wie bekannt, erstreckten sich unsere Versuche bisher nur auf Keimschläuche. An dieser Stelle muß ich nun ergänzend hinzufügen, daß bei Beginn der Versuche mit *Aspergillus niger* auch mit älteren Kulturen dieses Pilzes experimentiert wurde. Dann

1) Rabe, a. a. O., S. 323—324.

hatten sich die einzelnen Hyphen bereits zu einer dichten Decke verflochten, ein Umstand, der die Beobachtung sehr erschwerte und fast nur auf die am Rande der Decke befindlichen Hyphen beschränkte. Von den letzteren erwiesen sich manche nicht selten schon vor dem Gefrierversuch als abgestorben. Andere dagegen, die sich stets durch ihren größeren Durchmesser und die starke Vakuolisierung ihrer Zellen auszeichneten, zeigten, selbst wenn sie dem Gefrieren ausgesetzt wurden, eine auffallend große Widerstandsfähigkeit.

Die Ergebnisse dieser Versuche, bei denen ich stets darauf achtete, daß die Pilzdecke allseitig von der gefrorenen Nährflüssigkeit eingeschlossen war, gestalteten sich nämlich folgendermaßen.

Die beschriebenen Hyphen erwiesen sich bei Kultur in 1-proz. Traubenzuckerlösung bei — 6 ° C. nach zweistündiger Versuchszeit noch als lebend; erst nach Einwirkung einer Temperatur von — 8 C. wurden lebende Hyphen nicht mehr bemerkt Im Vergleich zu der Kälteempfindlichkeit der Keimschläuche war diese Resistenz noch auffälliger bei den vorgenannten Hyphen, die sich in 20- und 30-proz. Traubenzuckerlösung befanden. Im ersteren Falle blieben einige Fäden noch bei — 18 ° C. am Leben, im letzteren vermochte sogar eine Temperatur von — 26 ° C. eine größere Anzahl von Hyphen nicht zu schädigen. Im Anschluß hieran sei erwähnt, daß auch die Kälteresistenz der Konidienträger berücksichtigt wurde. Hierbei begnügte ich mich jedoch mit der Feststellung, daß diese nicht widerstandsfähiger sind als die Keimschläuche. Aus den bisherigen Beobachtungen geht jedenfalls zur Genüge hervor, daß die Entwicklungsphase des Pilzes für die Lage seines Erfrierpunktes von großer Bedeutung sein kann.

Wir konstatieren hier eine analoge Tatsache, wie sie bei höheren Pflanzen längst bekannt ist, daß nämlich bei ein und demselben Individuum einzelne Teile oder Organe in ungleichem Grade kälteempfindlich sind. So werden z. B. die Winterknospen unserer Holzpflanzen auch dann nicht geschädigt, wenn die sich entfaltenden und entfalteten Blätter und Blüten leicht erfrieren [1]). Interessant ist ferner die von Molisch festgestellte Tatsache, daß die Schließzellen der Spaltöffnungen vieler Blätter gegen das Erfrieren widerstandsfähiger sind als die übrigen Oberhaut- und Mesophyllzellen [2]).

1) Pfeffer, a. a. O., S. 302.
2) Molisch, a. a. O., S. 32.

Der genannte Autor sucht dies zu erklären, indem er meint, daß hierbei verschiedene Faktoren von Einfluß sind, wie z. B. die Größe der Zelle, die Kapillarität, die Konzentration des Zellsaftes und die spezifische Konstitution des Plasmas. Es liegt nun nahe, auch in unserem Falle die erhöhte Kälteresistenz älterer Hyphen in den von Molisch angeführten Ursachen zu suchen. Hierbei kommen das Volumen der Zelle und die Kapillarität als erklärende Momente gar nicht in Betracht, da die Zellen der resistenteren Hyphen deutlich größer sind. Auch durch eine erhöhte Konzentration des Zellsaftes kann die gesteigerte Widerstandsfähigkeit nicht bedingt sein, denn die Messung des Turgors ergab in älteren Hyphen stets geringere Werte als in Keimschläuchen, was sich aus der folgenden Tabelle ergibt.

Tabelle XX.

Versuchsobjekt: *Aspergillus niger*. Nährlösung: Traubenzucker.

C	Alter der Kultur	P
1 %	17—20 Std.	9
	1½ Tag	8
20 %	23—26 Std.	24
	2 Tage	22
30 %	30—34 Std.	30,5
	3 Tage	28

Wir sehen also, daß einfache physikalische Momente die Erhöhung der Kälteresistenz älterer Hyphen nicht zu erklären vermögen, vielmehr beruht dieselbe wahrscheinlich auf einer nicht näher definierbaren Veränderung der Konstitution des Protoplasmas. Merkwürdigerweise ist es in unserem Falle gerade das ältere Protoplasma, das sich widerstandsfähiger erweist, während sonst nicht selten das jüngere Protoplasma resistenter ist. Beispielsweise fand Apelt[1]), daß die Erfrierpunkte von Kartoffeltrieben keineswegs in allen Teilen die gleichen sind, sondern daß sich Basis, Mitte und Spitze desselben Triebes verschieden verhalten, indem sich nach der Spitze zu ein Sinken des Erfrierpunktes bemerkbar macht. In seinen näheren Darlegungen hält der Autor eine physikalische Er-

1) Apelt, Neue Untersuchungen über den Kältetod der Kartoffel. Cohns Beitr. z. Biologie d. Pfl., Bd. 9, Heft 2, S. 246, 1907.

klärung dieser Tatsache für ausgeschlossen und gelangt zu der Ansicht, daß die erhöhte Resistenz in der Konstitution des jüngeren Protoplasmas begründet liegt. Das Gleiche kann in unserem Falle für das ältere Protoplasma gelten. Übrigens mag noch erwähnt sein und ist gewiß an dieser Stelle nicht ohne Interesse, daß auch gegen das Austrocknen sich in gewissen Fällen, nämlich bei Kultur in konzentrierten Zuckerlösungen, ältere Entwicklungsstadien von *Aspergillus niger* resistenter verhalten als jüngere[1]).

3. Der Ersatz der relativ rasch wirkenden Erfriertemperatur durch längere Einwirkung von Temperaturen über dem Erfrierpunkt.

Wir zeigten bereits früher bei den Unterkühlungsversuchen, daß Temperaturen, die vorübergehend von unseren Objekten vertragen werden, nach längerer Einwirkung doch den Tod herbeiführen. Es war sehr wahrscheinlich, daß sich diese Tatsache auch bei unseren Gefrierversuchen bestätigte. Dann würde also die relativ rasch tödlich wirkende Erfriertemperatur durch eine längere Einwirkung etwas höherer Temperaturen ersetzt werden können.

Um dies zu entscheiden, wurden einige Versuche angestellt mit Keimschläuchen von *Aspergillus niger*, die einerseits in 1-proz., anderseits in 20-, sowie in 30- und 50-proz. Traubenzuckerlösung kultiviert worden waren. Bei diesen Gefrierversuchen kam es mir nicht darauf an, die Temperatur dauernd konstant zu halten, doch beobachtete ich stets die Vorsicht, daß die Temperatur nicht etwa im Verlauf des Versuchs ein Minimum erreichte, welches nach unseren früheren Erfahrungen bereits nach kurzer Einwirkung eine Schädigung zur Folge hatte. Wie die nachstehenden Tabellen XXI bis XXIV zeigen, liegen die Versuchstemperaturen stets über jenen Temperaturen, die schon nach zweistündiger Versuchsdauer von schädlichem Einfluß sind. Deshalb war bei den Versuchen mit den Kulturen in 1- und 20proz. Lösung ein gelegentliches Auftauen der Nährflüssigkeit nicht zu vermeiden, und ich muß es dahingestellt sein lassen, ob dieser Umstand für den schließlichen Effekt von Bedeutung war. Dagegen konnte ein Auftauen der 30- und 50-proz. Lösung mit Sicherheit vermieden werden. Alle Versuche zeigen das übereinstimmende Ergebnis, daß die Temperatur, bei welcher

1) Rabe, a. a. O., S. 308.

relativ rasch der Gefriertod eintritt, ersetzt werden kann durch längere Einwirkung höherer Temperaturen. Nebenbei ergibt sich aus den Tabellen ohne weiteres, daß auch hier die Objekte in den höheren Konzentrationen resistenter sind.

Tabelle XXI.

Versuchsobjekt: *Aspergillus niger*. Nährlösung: 1 % Traubenzucker.

Zeit	Temperatur	Bemerkungen	Resultat
9 Uhr Vorm.	— 0,8 ° C.	Nährlösung gefroren	
12 „ „	— 0,5 ° „		
1 „ Nachm.	— 1,0 ° „		
5 „ „	— 0,9 ° „		
6 „ „	— 0,5 ° „		Alle Objekte lebend
Nacht	—	Nährlös. während der Nacht aufgetaut	
8 Uhr Vorm.	+ 3,5 ° „		10 % tot
9 „ „	— 0,7 ° „		
11 „ „	— 0,6 ° „		
1 „ Nachm.	— 0,9 ° „		
3 „ „	— 0,8 ° „		
5 „ „	— 0,8 ° „		85 % tot

Tabelle XXII.

Versuchsobjekt: *Aspergillus niger*. Nährlösung: 20 % Traubenzucker.

Zeit	Temperatur	Bemerkungen	Resultat
9 Uhr Vorm.	— 4,4 ° C.	Nährlösung gefroren	
11 „ „	— 4,3 ° „		
1 „ Nachm.	— 3,6 ° „		
3 „ „	— 4,8 ° „		
5 „ „	— 3,2 ° „		
6 „ „	— 5,0 ° „		Objekte intakt
Nacht	—	Nährlös. während der Nacht aufgetaut, hierauf wieder gefroren	
8½ Uhr Vorm.	— 1,2 ° „		Objekte intakt
9 „ „	— 4,0 ° „		
11 „ „	— 3,7 ° „		
1 „ Nachm.	— 4,8 ° „		
3 „ „	— 4,7 ° „		
5 „ „	— 4,5 ° „		25 % abgestorben
6½ „ „	— 4,8 ° „		
Nacht	—	Nährlösung aufgetaut	
9 Uhr Vorm.	— 1,8 ° „		80 % tot

Tabelle XXIII.

Versuchsobjekt: *Aspergillus niger*. Nährlösung: 30 % Traubenzucker.

Zeit	Temperatur	Bemerkungen	Resultat
9 Uhr Vorm.	— 10,0 ° C.	Die Nährlösung bleibt	
11 „ „	— 8,5 ° „	während der ganzen	
12 „ „	— 9,4 ° „	Dauer des Versuchs	
5 „ Nachm.	— 7,8 ° „	gefroren	
6 „ „	— 9,8 ° „		Objekte intakt
Nacht	—		
9 Uhr Vorm.	— 4,2 ° „		
10 „ „	— 9,6 ° „		
2 „ Nachm.	— 7,2 ° „		30 % tot
4 „ „	— 10,0 ° „		
6 „ „	— 9,7 ° „		
Nacht	—		
8½ Uhr Vorm.	— 4,5 ° „		70 % tot

Tabelle XXIV.

Versuchsobjekt: *Aspergillus niger*. Nährlösung: 50 % Traubenzucker.

Zeit	Temperatur	Bemerkungen	Resultat
9 Uhr Vorm.	— 24 ° C.	Die Nährlösung ist	
tagsüber	zwisch. — 24 u. — 17 ° C.	während d. ganzen	
6 Uhr Nachm.	— 23 ° C.	Dauer d. Versuchs	
Nacht	—	gefroren	
8 Uhr Vorm.	— 12 ° „		Objekte intakt
8½ „ „	— 24 ° „		
tagsüber	zwisch. — 24 u. — 18 ° C.		
6 Uhr Nachm.	— 23,4 ° C.		
Nacht	—		
9 Uhr Vorm.	— 9,5 ° „		10 % abgestorben
9½ „ „	— 23 ° „		
tagsüber	zwisch. — 23 u. — 16 ° C.		
6 Uhr Nachm.	— 23,2 ° C.		
Nacht	—		
8½ Uhr Vorm.	— 11 ° „		55 % abgestorben
9 „ „	— 24 ° „		
tagsüber	zwisch. — 24 u. — 18 ° C.		
6 Uhr Nachm.	— 24,2 ° C.		
Nacht	—		
9 Uhr Vorm.	— 11,3 ° „		70 % abgestorben
9½ „ „	— 23 ° „		
tagsüber	zwisch. — 23 u. — 16 ° C.		
6 Uhr Nachm.	— 24 ° C.		
Nacht	—		
9 Uhr Vorm.	— 11,2 ° C.		Alle Objekte tot

Zu einem von unseren Resultaten scheinbar abweichenden Ergebnis gelangte Apelt[1]) bei seinen Untersuchungen über den Kältetod der Kartoffel. Dieser Autor gibt an, daß eine einmalige Abkühlung des Versuchsobjektes unter das spezifische Minimum nicht durch eine länger anhaltende Temperatur wenig über dem Erfrierpunkte ersetzt werden kann. Apelt hat aber seine Versuche nur über eine Zeit von höchstens 2 Stunden ausgedehnt. Auch bei meinen Versuchen vertragen die Objekte mehrere Stunden ohne merklichen Schaden niedrige Temperaturen, die über dem Erfrierpunkt liegen. Erst nach $1^1/_2$ oder mehreren Tagen tritt der Tod ein.

Freilich ist in theoretischer Beziehung, wie auch Apelt bemerkt, ein Unterschied zu machen zwischen dem relativ rasch eintretenden Erfrieren und dem Absterben, welches erst nach längerer Zeit erfolgt. Trotzdem vermögen wir durch diese Unterscheidung immer noch keine Aufklärung zu gewinnen, auf welche Weise die für die Erhaltung des Lebens unerläßliche funktionelle Harmonie[2]) im einen oder im anderen Falle gestört wird. Daß der gleiche Effekt, das Absterben in inframinimaler Temperatur, durch verschiedene Faktoren und Kombinationen bewirkt werden kann, hat bereits Pfeffer betont[2]).

Im Anschluß an unsere letzten Versuche bezüglich der Einwirkung niedriger Temperaturen über dem Erfrierpunkt wäre nun auch die Frage zu entscheiden, ob nicht ein rascher (eventuell öfters wiederholter) Wechsel von Gefrieren und Auftauen die Objekte in ihrer Widerstandsfähigkeit derartig schwächt, daß sie schließlich bei Temperaturen zugrunde gehen, die sie bei einmaligem Gefrieren während derselben Zeit ganz gut vertragen. In dieser Hinsicht sind ja bereits von Göppert[3]) verschiedene Versuche angestellt worden. Dieser Autor gibt an, daß Pflanzen, welche einer niedrigen Temperatur ausgesetzt waren, ohne dabei den Tod zu erleiden, dann wieder ins Warme gebracht und 4 bis 6 mal abgekühlt wurden, dies zwar noch aushalten, daß sie aber bei weiterer Wiederholung des Experiments absterben. Diese Ergebnisse sind neuerdings von Apelt bestätigt worden, indem er die Kartoffel als Versuchsobjekt benutzte[4]). Auch die Kartoffel kann mehrmals abgekühlt werden,

1) Apelt, a. a. O., S. 221.

2) Vgl. Pfeffer, a. a. O., S. 316.

3) Göppert, Wärmeentwicklung in den Pflanzen usw., 1830, S. 62; Gefrieren, Erfrieren usw., 1883, S. 49.

4) Apelt, a. a. O., S. 260.

ohne dadurch Schaden zu nehmen. Wird sie aber 6 mal einer Temperatur ausgesetzt, die wenig über ihrem spezifischen Erfrierpunkte liegt, so tritt der Tod ein.

Ähnliche Versuche wie die mitgeteilten würden auch mit meinen Objekten leicht auszuführen gewesen sein, was ich leider versäumt habe. Ich konnte aber nicht umhin, die Frage bezüglich der Wirkung des wiederholten Gefrierens und Wiederauftauens an dieser Stelle zu berühren wegen des theoretischen Interesses, das sie uns bietet.

III. Theoretische Betrachtungen.

Am Schluß unserer Experimente angelangt, wollen wir auf Grund der gesammelten Erfahrungen im folgenden eine kurze Betrachtung anstellen über das Zustandekommen des Erfriertodes und die Erhöhung der Kälteresistenz unserer Objekte.

Wie wir gezeigt haben, können wir zwei Arten des Erfrierens unterscheiden, nämlich einerseits einen Kältetod, der ohne eine Eisbildung erfolgt, anderseits ein Absterben, das wir als den „Eistod" bezeichnen wollen, weil es dann eintritt, wenn die Nährlösung gefroren ist und ein spezifisches Temperaturminimum erreicht wird. Jeder der beiden Erfrierprozesse beruht offenbar auf anderen Ursachen, was sich dadurch kundgibt, daß der ohne Eisbildung eintretende Kältetod erst nach längerer Zeit erfolgt, während der Eistod relativ rasch eintritt.

Was das Erfrieren ohne Eisbildung anbelangt, so sagt Pfeffer[1]), daß in niedriger Temperatur, infolge der Reduktion der Gesamttätigkeit des Organismus, die Störung der funktionellen Harmonie im allgemeinen ein langsames Absterben veranlassen wird. Auch Molisch[2]) weist darauf hin, daß es irgendwelche Störungen im Getriebe des Lebens sein werden, die allmählich den Tod herbeiführen. Lidforss[3]) hält es dabei für wahrscheinlich, daß der Stoffwechsel durch die niedrige und den betreffenden Pflanzen ungewohnte Temperatur in anormale Bahnen gelenkt wird, wodurch schließlich ein tödlicher Effekt zustande kommt. Jedenfalls sind wir über die näheren Gründe, die das Erfrieren ohne Eisbildung veranlassen, nicht hinreichend orientiert.

---

1) Pfeffer, a. a. O., S. 317.
2) Molisch, a. a. O., S. 65.
3) Lidforss, Die wintergrüne Flora. Lund 1907, S. 50.

Was aber die Ursachen des Eistodes anbetrifft, so spielt sicherlich die Eisbildung in der Nährlösung und das Gefrieren der Objekte dabei eine Rolle. Es ist jedoch nicht möglich, eine generelle Erklärung hierdurch zu geben, da der Eistod sich uns in verschiedener Weise darbietet.

In gewissen Fällen scheint die beim Gefrieren eintretende Wasserentziehung auf unsere Objekte tödlich zu wirken, und wir könnten uns der Theorie von Müller-Thurgau und Molisch anschließen, die den Gefriertod als einen Austrocknungstod betrachten[1]). In anderen Fällen aber tritt der Tod relativ rasch bei einer Temperatur ein, bei der eine ansehnliche Wasserentziehung voraussichtlich noch nicht erfolgt, sondern bei welcher schon bei Eisbildung in der Nährlösung in Kombination mit einem spezifischen Minimum ein letaler Effekt erzielt wird. Im Gegensatz zu diesem und dem vorerwähnten Verhalten erwiesen sich unsere Objekte unter gewissen Bedingungen noch bei Temperaturen resistent, bei denen eine gewisse Wasserentziehung sicherlich erfolgt ist. Es wäre aber in diesem Falle denkbar, daß nur ein gewisses Maß der Wasserentziehung vertragen wird, während bei weiterem Wasserentzug, der ja mit tiefer sinkender Temperatur erfolgen muß, der Tod eintritt. Bekanntlich wird sich nach den Erfahrungen, die man in der physikalischen Chemie beim Gefrieren von Lösungen gemacht hat[2]), das Gefrieren des Zellsaftes in der Weise abspielen, daß zunächst eine gewisse Menge reines Wasser ausfriert und die Lösung konzentrierter wird. Bei weiterer Temperaturerniedrigung wird wiederum Wasser ausfrieren und zwar solange, bis bei einer gewissen Temperatur schließlich eine konzentrierte Lösung von niedrigstem Gefrierpunkte zurückbleibt. Mez[3]) hat bereits darauf hingewiesen, daß aus dieser Lösung von höchster Konzentration das Wasser auch durch die niedrigsten Temperaturen nicht von den Salzen abgespalten wird in der Weise, daß alles Wasser für sich gefrieren und das Salz rein für sich ausfallen würde, sondern die konzentrierte Salzlösung erstarrt wie ein homogener Körper als sogenanntes „eutektisches Gemisch“[4]) bei einer Temperatur, die man als den eutektischen Punkt bezeichnet. Nun würden wir bei

1) Müller-Thurgau, a. a. O., 1886, S. 534; Molisch, a. a. O., S. 26.

2) Nernst, Theor. Chemie, 1903, S. 126.

3) Mez, Neue Untersuchungen über das Erfrieren eisbeständiger Pflanzen. Flora, 1905, S. 95.

4) Nernst, a. a. O., S. 152.

denjenigen unserer Objekte, die eine gewisse beim Gefrieren erfolgende Wasserentziehung vertragen, wohl der Entscheidung der Frage näher kommen, ob ein weitergehender Wasserentzug schädlich wirkt, wenn wir über die Lage des eutektischen Punktes orientiert wären. Letztere aber ist abhängig von der Natur der gelösten Stoffe und bei unseren Objekten nicht zu ermitteln, sodaß deshalb eine weitere Erörterung unserer letzterwähnten Frage nicht geboten ist. Zugleich bleibt offen, ob und bei welcher Temperatur auch innerhalb der Pilzzellen eine Eisbildung Platz greift und eventuell für die Resistenz von Bedeutung wird.

Wir wollen hiermit von weiteren Betrachtungen über den speziellen Vorgang des Erfrierens absehen und wenden uns schließlich noch der Tatsache zu, daß die Kälteresistenz mit zunehmender osmotischer Leistung erhöht wird.

Dieses Verhalten unserer Objekte erscheint ja auf den ersten Blick aus lediglich physikalischen Gründen einleuchtend, denn „bis zu einem gewissen Grade kann freilich die Widerstandsfähigkeit schon durch die Erhöhung des Gefrierpunktes des Zellsaftes und der Imbibitionsflüssigkeit der Zellhaut gesteigert werden“ [1]). So wäre es zu verstehen, daß gewisse kälteertragende Pflanzen einen sehr konzentrierten Saft besitzen[2]), und daß wintergrüne Gewächse bei Beginn der kälteren Jahreszeit ihren Turgor erhöhen[3]). Was aber die Turgorerhöhung bei unseren Objekten anbelangt, so zeigten wir bereits, daß durch die Steigerung der osmotischen Leistung die Erhöhung der Resistenz aus einfachen physikalischen Ursachen nicht erklärt werden kann, denn einmal tritt auch bei Vermeidung des Gefrierens eine Abnahme der Kälteempfindlichkeit ein, dann aber besteht keine einfache Beziehung zwischen der Steigerung der osmotischen Leistung und dem Sinken des Erfrierpunktes. Es mag erwähnt sein, daß Apelt[4]) bei seinen Untersuchungen über das Erfrieren der Kartoffel zu einem analogen Resultate gelangte. Wie bereits Müller-Thurgau[5]) feststellte und durch Apelt bestätigt wurde[6]), erniedrigt die Kartoffel ihren Erfrierpunkt nach vorheriger Kaltlagerung, wobei ein Teil ihrer

1) Pfeffer, a. a. O., S. 317.
2) Cavaras, Bullet. d. Soc. Bot. Ital., 1901, p. 146.
3) Lidforss, a. a. O., S. 66.
4) Apelt, a. a. O., S. 239.
5) Müller-Thurgau, Landw. Jahrb., Bd. XI, 1882, S. 826 ff.
6) Apelt, a. a. O., S. 221.

Stärke in Zucker umgewandelt und demgemäß der Turgor erhöht wird. In der hierdurch bewirkten Gefrierpunktserniedrigung sieht Müller-Thurgau[1]) die Ursache der gesteigerten Kälteresistenz. Apelt[2]) gelangte jedoch auf Grund quantitativer Zuckerbestimmung zu dem Ergebnis, daß die durch die Umwandlung der Stärke in Zucker erzielte Gefrierpunktserniedrigung viel zu gering ist, um die tiefere Lage des Erfrierpunktes der kaltgelagerten Kartoffel zu erklären. Aus diesen wie aus unseren Erfahrungen ergibt sich, wie sehr es weiterhin nötig ist, in bezug auf die Kälteresistenz Tatsachen zu ermitteln, die mit einer Änderuug der Turgorenergie verknüpft sind. Vermutlich sind auch in anderen Fällen die Beziehungen zwischen Turgor und Kälteresistenz nicht so einfacher Art, als es auf den ersten Blick den Anschein hat.

Nun wäre eine Erklärung für die Erhöhung der Kälteresistenz unserer Objekte immer noch möglich, wenn sich nachweisen ließe, daß mit der Anhäufung osmotisch wirksamer Stoffe zugleich eine Vermehrung solcher Zellinhaltsbestandteile verknüpft ist, die in irgend einer Weise für die Pflanze einen Erfrierschutz bedeuten. Daß sich in gewissen Pflanzen Stoffwechselprozesse abspielen, die möglicherweise die Kälteresistenz günstig zu beeinflussen imstande sind, darauf weisen die Erfahrungen verschiedener Autoren hin.

So fand Fischer[3]), daß bei gewissen Bäumen, die er als „Fettbäume“ bezeichnet, im Spätherbst die gesamte Stärke bis auf einen Teil der Rindenstärke, der sich in Glykose umsetzt, in fettes Öl umgewandelt wird, während bei anderen Holzgewächsen, den sogen. „Stärkebäumen“, zwar die Reservestärke in Holz und Mark unverändert bleibt, hingegen die Rindenstärke in Glykose übergeführt wird. Bezüglich der Umwandlung der Stärke in fettes Öl deutet der erwähnte Autor an, daß es sich hierbei um eine Erhöhung der Kälteresistenz handeln könne[4]), indem die Einlagerung von Fett in das Protoplasma und die damit zusammenhängende Verdrängung des Wassers aus demselben das letztere entschieden unempfindlicher gegen Kälte mache. Auch Mez[5]) erblickt in der Anhäufung von fettem Öl einen Erfrierschutz, wenn er ihn auch in anderer

1) Müller-Thurgau, Landw. Jahrb., Bd. XI, 1882, S. 826 ff.

2) Apelt, a. a. O., S. 239.

3) Fischer, Beiträge zur Physiologie der Holzgewächse. Jahrb. f. wiss. Bot., Bd. XXII, 1891, S. 159.

4) Fischer, a. a. O., S. 155.

5) Mez, a. a. O., S. 121.

Weise zu erklären sucht. Über die Bedeutung der winterlichen Zuckeranhäufung hat sich Fischer in seinen Untersuchungen nicht geäußert, dagegen lieferte Lidforss[1]) zu diesem Punkte interessante Beiträge. Die Beobachtung, daß viele wintergrüne Gewächse im Herbst ihre Stärke in Zucker verwandeln und erst im Frühjahr letzteren wieder in Stärke regenerieren, hatte es dem genannten Autor wahrscheinlich gemacht, daß die winterliche Zuckeranhäufung einen Schutz gegen das Erfrieren bedeute. Hierfür sprachen auch verschiedene von Lidforss mit gutem Erfolge ausgeführte Experimente. So stellte er abgeschnittene Blätter verschiedener Versuchspflanzen mit den Stielen in Zuckerlösung und brachte die Objekte dann zusammen mit Blättern, die eine entsprechende Zeit in reinem Wasser gesteckt hatten, in Temperaturen unter Null. Während nun die Kontrollblätter erfroren, waren die mit Zucker gefütterten Blätter meist unversehrt oder nur partiell geschädigt. Auch mit Keimwurzeln wurden analoge Resultate erzielt. So ergab sich denn als Gesamtresultat dieser Versuche, daß in der Tat das Vorhandensein von Zucker in gewissen Fällen einen Erfrierschutz bedeutet. Nach diesen Erfahrungen liegt es nahe, die gesteigerte Resistenz unserer Objekte in Beziehung zu bringen mit einer Vermehrung gewisser die Kälteempfindlichkeit herabsetzender Stoffe in der Pilzzelle, in erster Linie mit einer Steigerung des Zuckergehaltes. Daß in der Tat der Zuckergehalt der auf Traubenzuckerlösung gewachsenen Kulturen von *Aspergillus niger* mit steigender Konzentration der Nährflüssigkeit zunimmt, lehren die Analysenresultate von v. Mayenburg[2]). Nach seinen Angaben enthielten frische Pilzdecken auf einer 3% Dextrose enthaltenden Kulturflüssigkeit nur Spuren direkt reduzierender Zuckerarten sowie 0,33% spaltbare Saccharosen, dagegen auf 50-proz. Lösung: 2% direkt reduzierende Zuckerarten und 1,9% spaltbare Saccharosen. Eine derartige Vermehrung des Zuckergehaltes in der Pilzzelle erscheint jedoch ausgeschlossen bei der Kultur der Objekte auf isotonen Salpeterlösungen, bei deren Darbietung doch auch mit zunehmender osmotischer Leistung eine Steigerung der Kälteresistenz eintrat. Aus diesem Grunde ist es wohl kaum angängig, die Lidforssschen Ergebnisse für eine generelle Erklärung unserer Versuchsresultate zu verwenden. Wir

1) Lidforss, a. a. O., S. 21—38 u. ff.
2) v. Mayenburg, a. a. O., S. 411.

können zurzeit nicht entscheiden, ob die Erhöhung der Kälteresistenz unserer Objekte durch eine Anhäufung von Zucker oder irgendwelcher anderer Stoffe bewirkt wird.

So ergibt sich denn aus unseren Ausführungen, daß zurzeit weder physikalische noch chemische Momente die Erhöhung der Kälteresistenz bei Schimmelpilzen in hinreichender Weise aufzuhellen vermögen. Hier gilt dasselbe, was Pfeffer[1]) in bezug auf die erhöhte Kältewiderstandsfähigkeit gewisser Organe und Entwicklungsphasen ausspricht: „So lange wir nicht wissen, durch welche Besonderheiten der Struktur usw. die mehr oder minder große Widerstandsfähigkeit des Protoplasmas bedingt ist, vermögen wir auch nicht die Veränderungen zu präzisieren, durch welche das Protoplasma . . . eine höhere Resistenz gegen Kälte gewinnt". In diesem Satze ist das Problem gekennzeichnet, ohne dessen Lösung eine völlige Einsicht auch in die von uns gewonnenen Erfahrungen nicht erreicht wird.

D. Zusammenfassung.

Die wichtigsten Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen sich in folgender Weise zusammenfassen:

1. Die untersuchten Schimmelpilze vermögen in unterkühlter Nährlösung eine gewisse Zeit niedrige Temperaturen zu vertragen, die gewöhnlich beim Gefrieren der Nährlösung während der gleichen Versuchsdauer tödlich wirken.

2. Bei längerer Versuchsdauer tritt auch in unterkühlter Nährlösung der Tod ein. Hierbei ist mit zunehmender Konzentration des Substrats eine Steigerung der Kälteresistenz zu konstatieren.

3. Mit der Zunahme der osmotischen Leistung der Objekte geht ein Sinken des spezifischen Erfrierpunktes Hand in Hand. Es besteht jedoch keine einfache Beziehung zwischen der Steigerung der osmotischen Leistung und dem Sinken des Erfrierpunktes.

4. Der Gefriertod kann nicht schlechthin durch Wasserentziehung bewirkt sein, denn diese wird in gewissen Fällen vertragen, in anderen wiederum liegt der Erfrierpunkt noch über der Temperatur, bei der voraussichtlich erst eine erhebliche Wasserentziehung eintreten würde.

---

1) Pfeffer, a. a. O., S. 317.

5. Die Kälteresistenz der einzelnen Schimmelpilzarten ist spezifisch verschieden.

6. Isotone Nährlösungen verschiedener Qualität haben bezüglich der Kälteresistenz der Objekte annähernd den gleichen Effekt. Nur bei *Aspergillus niger* machte sich bei Darbietung von Salpeterlösung eine Verminderung der Kälteresistenz bemerkbar.

7. Für die Lage des Erfrierpunktes ist die Entwicklungsphase des Pilzes von Bedeutung.

8. Die relativ rasch wirkende Erfriertemperatur kann durch längere Einwirkung von Temperaturen über dem Erfrierpunkt ersetzt werden.

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Versuche wurden im botanischen Institut der Universität Leipzig ausgeführt. Es sei mir gestattet, meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Geh. Rat Professor Dr. W. Pfeffer, meinen aufrichtigsten Dank auszusprechen für die Anregung und Unterstützung, die er mir jederzeit zuteil werden ließ. Ferner bin ich auch Herrn Professor Dr. A. Nathansohn zu großem Dank verpflichtet.

VITA.

Ich, Hugo Bartetzko, katholischer Konfession, wurde am 18. September 1879 in Königshütte geboren. Nach sechsjährigem Besuch der Volksschule erhielt ich von Ostern 1891 ab meine wissenschaftliche Vorbildung auf dem humanistischen Gymnasium zu Neiße. Nachdem ich Ostern 1898 die Reife für Prima erlangt hatte, widmete ich mich dem Apothekerberuf und erhielt meine erste pharmazeutische Ausbildung in der Apotheke zu Wansen (Bez. Breslau). Im Juni 1901 bestand ich vor der Kgl. Prüfungskommission in Breslau die pharmazeutische Vorprüfung mit der Note I, worauf ich drei Jahre in mehreren Apotheken praktisch tätig war. Mit Beginn des Wintersemesters 1904/05 bezog ich die Universität Leipzig, wo ich zunächst Pharmazie studierte. Im Mai 1906 bestand ich vor der Kgl. Prüfungskommission in Leipzig die pharmazeutische Staatsprüfung mit der Note I, worauf ich mich naturwissenschaftlichen Studien widmete.

Ich hörte die Vorlesungen der Herren Professoren und Dozenten: Beckmann, Boehm, Correns, Credner, Deußen, Hantzsch, Lockemann, Miehe, Nathansohn, Pfeffer, Wiener.

Praktisch arbeitete ich im botanischen Institut und im Laboratorium für angewandte Chemie der Universität Leipzig.